

**INHALTSSTOFFE UND STRUKTUR DER
CARDENOLIDE VON CALOTROPIS
GIGANTEA**

von

Hannsjörg Wunschel

aus

Waldmünchen/Opf.

1973 # 209



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548410_0020

INHALTSSTOFFE UND STRUKTUR DER CARDENOLIDE VON CALOTROPIS GIGANTEA

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt
von
Hansjörg Wunschel
aus
Waldmünchen/Opf.

Als Dissertation genehmigt
von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

INHALTSSTOFFE UND STRUKTUR DER
CARBONOLIDE VON CALOTRIPS
GIGANTEA



Tag der mündlichen Prüfung: 12. März 1973

Dekan: Prof. Dr. W. Heumann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hesse

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.J. Bestmann

Meinem verehrten Lehrer Herrn Professor Dr. G.Hesse danke ich für die vielseitigen Anregungen und die großzügige finanzielle Unterstützung während dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. H.Engelhardt, der mich mit der Methodik dieses Arbeitsgebietes vertraut machte und wertvolle Anregungen bei der Durchführung der Arbeit gab.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Allgemeiner Teil	4
I. Vorkommen, Anwendung und Strukturvorschläge der Calotropis-Wirkstoffe	4
II. Verfahren zur Isolierung pflanzlicher Inhaltsstoffe	12
III. Qualitative und quantitative Auftrennung der Herzglykoside	15
C. Spezieller Teil	17
I. Inhaltsstoffe des Latex von Calotropis gigantea	17
1. Aufarbeitung des Milchsafte	17
2. Identifizierung der Pflanzenharze	20
3. Chromatographische Trennung der Herzgifte	22
II. Untersuchungen zur Glykosidstruktur	26
1. Brenzungsprodukte des Calotropins	26
2. Ätherspaltungen mit $MgCl_2$	34
3. Girard-Spaltung von Uscharin	37
4. $MgCl_2$ -Spaltung von Uscharidin	39
5. Untersuchungen zur Struktur des Herz- giftzuckers	54
a) Dünnschichtchromatographischer Nachweis	54
b) Untersuchung der DNP's	59
c) Silylierung	61
d) Umsetzung mit Bortriäthyl	64
e) Permethylierung	65
6. Mechanismus der Uscharidin-Spaltung	68
III. Synthetische Zuckerstruktur	71
D. Experimenteller Teil	83
1. Allgemeines	83
2. Beschreibung der Versuche	85
E. Literaturverzeichnis	III

Zusammenfassung

Aus dem Milchsafte von *Calotropis gigantea* wurden mit einer neuartigen Methode der Aufarbeitung unter schonenden Bedingungen die Inhaltsstoffe isoliert.

Dazu wurde aus dem Latex das Wasser durch Gefriertrocknung entfernt. Danach wurden die Amyrine extrahiert und als Taraxasterolester identifiziert. Anschließend wurden die Cardenolide quantitativ in drei Extrakte aufgeteilt und mit chromatographischen Methoden aufgetrennt. Durch Vergleich mit den aus dem Latex von *Calotropis procera* isolierten Herzgiften konnten die Hauptherzgifte Voruscharin, Ucharin und Calotropin, sowie das in Spuren vorkommende Genin in beiden Pflanzen bestätigt werden. Die im Latex von *Calotropis procera* zusätzlich gefundenen Cardenolide Calactin und Calotoxin, sowie Uzarigenin, Syriogenin, Procerosid und das Chromatographie-Artefakt "Boraxsäure" wurden bei *Cal. gigantea* nicht gefunden.

Die von T. Reichstein vorgeschlagene Struktur des glykosidischen Anteils der *Calotropis*-Cardenolide konnte bei Ucharidin bewiesen werden. Durch eine milde Abspaltung mit $MgCl_2$ in absoluten Lösungsmitteln wurde der "Herzgiftzucker" durch Vergleich der Massenspektren, der Silylierungs- und Permethylierungsprodukte mit dem später durch einen neuartigen Syntheseweg erhaltenen 2-Methyldihydropyranon(4)-Ol(5) bestätigt. Für die im Steroid-Gerüst bereits bewiesenen Strukturen der *Calotropis*-Cardenolide können nun die endgültigen Formeln des Gesamt-Glykosids angegeben werden.

Durch die Isolierung der Reaktionsprodukte und die Verfolgung der $MgCl_2$ -Spaltung in verschiedenen absoluten Lösungsmitteln wird ein Vorschlag für den vermutlichen Reaktionsmechanismus gemacht.

A. EINLEITUNG

Herzwirksame Glykoside als pflanzliche Inhaltsstoffe konnten mittlerweile in den Wurzeln, Stielen, Blättern, Samen und der Rinde einiger geographisch weit verbreiteter Pflanzen gefunden werden. In der Literatur finden sich Hinweise besonders auf die Familien der Apocynaceen, Asclepiadaceen, Liliaceen, Moraceen, Ranunculaceen und Scrophulariaceen¹⁾. Die meisten dieser Pflanzen wachsen in tropischen Gebieten von Asien, Afrika und Südamerika, wo die Wirkstoffe von den Eingeborenen seit langem als Pfeilgifte, in Form von Medizin oder für kriminelle Delikte verwendet werden. Für einen gezielten Einsatz als Herzmittel kamen in Europa erst relativ spät die Digitalis-Drogen zur Anwendung. 1785 erzielte damit W. Withering²⁾ große therapeutische Erfolge, und seine Ratschläge werden auch in der jetzigen Medizin durchaus noch anerkannt. Den ersten Einblick in den strukturellen Charakter dieser Verbindungen gaben 1915 die Arbeiten von A. Windaus³⁾. Die biogenetische Zugehörigkeit zur Gruppe der Triterpene und umfassende Strukturaufklärungen lieferten u. a. die Beiträge von W. A. Jacobs (1922 bis 1934) am Rockefeller Institut (New York)⁴⁾, A. Stoll⁵⁾ bei der Firma Sandoz in Basel, sowie T. Reichstein¹⁾ an der Universität Basel.

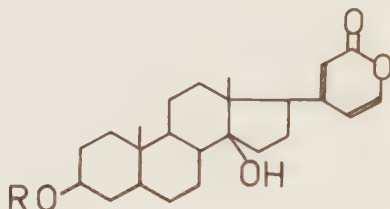
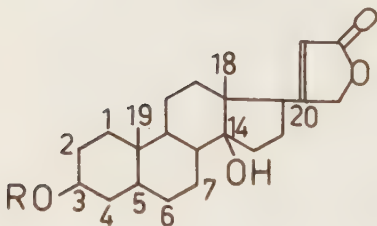
Danach sind alle bis heute bekannten Herzglykoside nach folgendem, allgemeinen Schema aufgebaut:

- a) $R-O-(D-O)_{1-3} - (Glucoseres-O-)_{1-2} - H$
- b) $R-O-(D-O)_1 \text{ oder } 3 - H$
- c) $R-O-(Glucoseres-O-)_{1-2} - H$

R = Aglykon

D = Desoxyzuckerrest

Unter Aglykon oder Genin versteht man ein Steroid, das als Seitenkette einen ungesättigten Lacton-Ring^{6, 7)}, eine β -ständige OH-Gruppierung an C-14⁸⁾ und dadurch eine cis-ständige Konfiguration der Ringe C und D des Steroidgrundgerüsts aufweist. Je nach Art des Lacton-Ringes wird zwischen einem C₂₃-Aglykon (Digitalis-Strophantus-Typ) und einem C₂₄-Aglykon (Scilla-Bufo-Typ) unterschieden.*)



C₂₃ (Digitalis-Strophantus-Typ) C₂₄ (Scilla-Bufo-Typ)

Die in den Herzglykosiden auftretenden Desoxyzucker sind Methylpentosen (6-Desoxyzucker) oder sie leiten sich davon entweder durch Methylierung der Hydroxylgruppe an C₃' oder dadurch, daß C₂' in reduzierter Form vorliegt (2,6-Desoxyzucker, 2-Desooxymethyl-Pentosen).

*) Der Nomenklatur der Steroide werden in dieser Arbeit die I.U.P.A.C.-Regeln von 1957 zugrunde gelegt; siehe: Handbook for Chemical Society Authors. The Chemical Society, London (1960). Diese Regeln haben sich zum großen Teil in allen neueren Veröffentlichungen durchgesetzt.

Kommen in einem Herzglykosid Desoxyzucker und Glucose zusammen vor, so ist der Desoxyzucker immer direkt mit dem Aglykon verbunden. In solchen Fällen ist die Spaltung der glykosidischen Bindung zwischen Desoxyzucker und Steroid sehr schwierig.

B. ALLGEMEINER TEIL

I. Vorkommen, Anwendung und Strukturvorschläge der Calotropis-Wirkstoffe

Die einzige Ausnahme von diesem Strukturschema machen die Calotropis-Glykoside, die aus Inhaltsstoffen der bis zu 5 Meter hohen Sträucher und Bäume von *Calotropis procera* und *Calotropis gigantea* isoliert wurden. Diese Pflanzen gehören zur Gattung der Seidenpflanzengewächse (*Asclepiadaceen*) und sind botanisch nahe verwandt. Sie finden sich in den tropischen Regionen von Asien und Afrika. Die Pflanzen (in Indien auch als Mudarpflanze bezeichnet) haben gegenständige, unterseitig weißfilzige Blätter mit purpurroten, geruchlosen Blüten. *Calotropis gigantea* unterscheidet sich von *Calotropis procera* durch die breiteren Blätter, die oft auch blaugrün behaart sind. Die medizinische und toxische Verwendung fast aller Pflanzenteile ist den Eingeborenen bekannt. So wurde der Milchsaft jahrhundertlang von verschiedenen afrikanischen Volksstämmen zur Bereitung von Pfeilgift verwendet. In Indien wird den Blüten in entsprechender Dosierung eine verdauungsfördernde, magenstärkende und kräftigende Wirkung zugeschrieben⁹⁾. Die getrocknete Rinde wird als Ersatz für Brechwurz und als schweißtreibendes Mittel in Dosierungen von etwa 0,2 bis 0,7 g gegeben. Der Milchsaft ist ätzend und wirkt wie ein heftiges Abführ- und Brechmittel. Außerdem wird behauptet, daß er zum Kindermord, als Abtreibungsmittel, zum Selbstmord, aber selten zum Mord verwendet wird. Ein Extrakt der Blätter wird bei Wechselfieber angewandt und soll die Anfälle effektvoller als Chinin unterbinden¹⁰⁾.

Als Erster hat sich mit den toxikologischen Eigenschaften L. Lewin^{11), 12)} beschäftigt und im Milchsaft eine digitalisartige Wirksamkeit gefunden, denn bei subcutaner Verabreichung ergibt sich das Bild der Digitaliswirkung: Steigerung der Herzarbeit, Schweißausbruch, Unregelmäßigkeiten im Bewegungsablauf, dann systolisches Kontraktionsbeharren und schließlich Herzstillstand. Für eine Standardisierung dieser Digitaliswirkung wurde von Toxikologen ein Verfahren ausgearbeitet, wobei die letale Dosis in mg Herzgift pro kg anästhesierte Katze (sogenannte "Katzeneinheit") angegeben wird¹³⁾.

Im Arbeitskreis von GHesse wurden nun über einen längeren Zeitraum hinweg die Inhaltsstoffe des Milchsaftes, der Blätter und Stengel von *Calotropis procera* untersucht¹⁴⁾. Von Hassal und Mitarbeitern^{40, 41)} wurden ebenfalls Strukturvorschläge der *Calotropis*-Wirkstoffe gebracht. Die Beweisführung dieser Autoren weist aber vor allem in der Interpretation der UV-Spektren Lücken auf, denn sowohl Calotropin wie Calactin enthalten nach ihren UV-Spektren ($\lambda_{1 \text{ max}}^{\text{Alk}} = 217 \text{ nm}, \epsilon \approx 17000$; $\lambda_{2 \text{ max}}^{\text{Alk}} = 305 - 310 \text{ nm}, \epsilon = 35,5$) neben dem Butenolidring nur noch eine Carbonylgruppe, die nach dem IR-Spektrum als Aldehydgruppe des Genins interpretiert werden kann. Für das Vorliegen einer zusätzlichen Ketogruppe im Zuckeranteil gibt es keine Anhaltspunkte. Im Uscharidin dagegen ist die Anwesenheit einer und nicht zweier Ketogruppen mit den Spektren in Übereinklang zu bringen. Da die *Calotropis*-Glykoside nach den Befunden von Hassal et al. aber von 4,6-Didesoxyhexulosen (Osonen) abgeleitet werden, ergibt sich hier ein von den Autoren nicht geklärter Widerspruch.

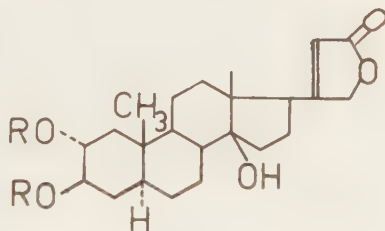
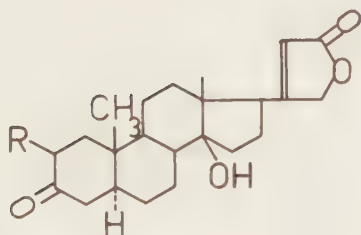
Eine Untersuchung der Samen von *Calotropis procera* wurde 1955 von Rajagopalan et al. durchgeführt⁴²⁾.

So wurden für die Calotropis-Herzgifte die Besonderheiten gefunden, die diese Wirkstoffe innerhalb der Reihe der herzwirksamen Drogen besonders interessant macht. Bei Usscharin und Vorusscharin wurden außer den normalen Bestandteilen auch noch Stickstoff und Schwefel in einem Δ^2 -Thiazolin- bzw. Thiazolidinring gefunden²¹⁾. Keine dieser Verbindungen läßt sich mit Säure in Zucker und Aglykon hydrolysieren, was ein Hinweis auf die besondere Verknüpfung dieser beiden Bestandteile ist. Erst bei der Behandlung mit Alkali tritt in vielen Fällen Abspaltung der Zuckerkomponente ein^{14), 16), 20)}, die aber meist Umlagerungsprodukte ergibt. Bei der Pyrolyse von Calotropin und Calactin wurden die kristalline, optisch aktive "Herzgiftmethylreduktinsäure" (HMRS) und Calotropagenin gefunden³⁵⁾. Insgesamt wurden von Hesse und Mitarbeitern^{14) bis 39)} neben Calotropagenin, Taraxasterol und seinem O-Acetylderivat folgende sechs Cardenolide isoliert, die alle Derivate des gleichen Aglykons, des Calotropagenins sind:

Vorusscharin	$C_{31}H_{43}NO_8S$
Usscharin (Hauptprodukt)	$C_{31}H_{41}NO_8S$
Usscharidin	$C_{29}H_{38}O_9$
Calactin	$C_{29}H_{40}O_9$
Calotropin	$C_{29}H_{40}O_9$
Calotoxin	$C_{29}H_{40}O_{10}$

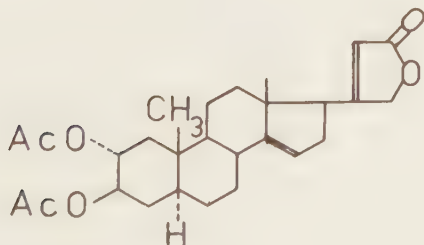
In einer neuerlichen Untersuchung des Latex von Calotropis procera durch T. Reichstein et al.⁴³⁾ konnten drei weitere Cardenolide isoliert werden: Uzarigenin, Syriogenin (ein β -, 14α -, x-trihydroxycard-(20:22)-enolid) und Procerosid. Die Autoren geben aber an, der Milchsafte hätte unter dem Transport gelitten, da

die Versandgefäße (Aluminiumkannen) stark korrodiert seien. Eine Artefaktbildung kann also nicht ausgeschlossen werden. Etwa zum selben Zeitpunkt wurde im gleichen Arbeitskreis ein Strukturbeweis für die endgültige Formel des Calotropagenins durchgeführt⁴⁴⁾ und daraus die vermutliche Struktur der Calotropis Glykoside abgeleitet⁴⁵⁾. Die genannten Autoren überführten das Uzrigenon (I) mit $Pb(OAc)_4$ in die Acetoxyverbindung (II) und dann in Gomphogenin (III). Die aus dem Diacetyl-derivat (IV) erhaltene β -Anhydroverbindung (V) ist mit einem von Watson und Wright aus Gomphocarpus fruticosus erhaltenen Gomphosid-Derivat identisch:



I : R = H
II : R = O-Ac

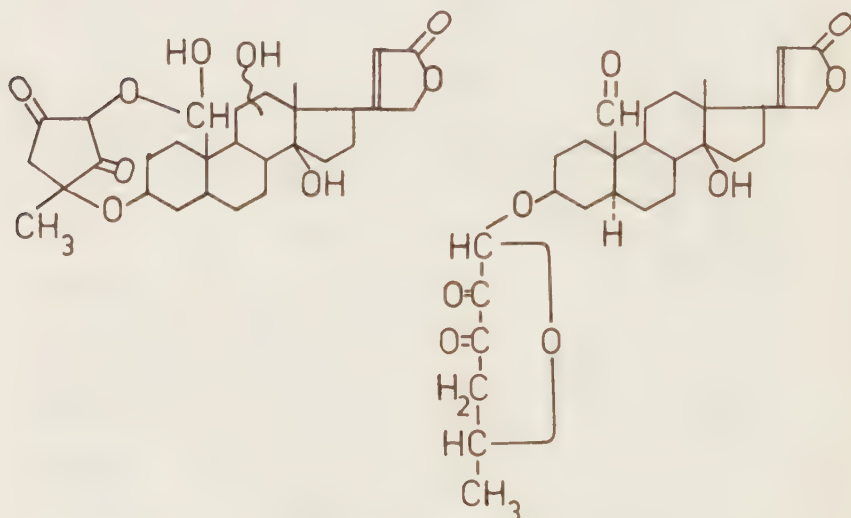
III : R = H
IV : R = Ac



V

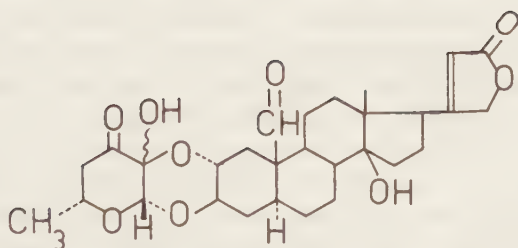
Dieses Ergebnis im Vergleich mit analogen beim Calotropagenin gefundenen Verbindungen ergeben die Calotropagenin-Struktur als ein 2 α -, 3 β -, 14 β -trihydroxy-19-oxo-5 α -card-(20:22)enolid.

Nach einer Diskussion über die bei den Brenzungsversuchen erhaltenen "Herzgiftmethylreduktinsäure" schlagen T. Reichstein und Mitarbeiter⁴⁵⁾ neue Strukturen für die Calotropis-Cardenolide vor. So erhalten z. B. die Strukturen von Ucharidin nach Hesse und Lettenbauer³⁰⁾ bzw. nach Hassal et al.⁴¹⁾ einen neuen Vorschlag:



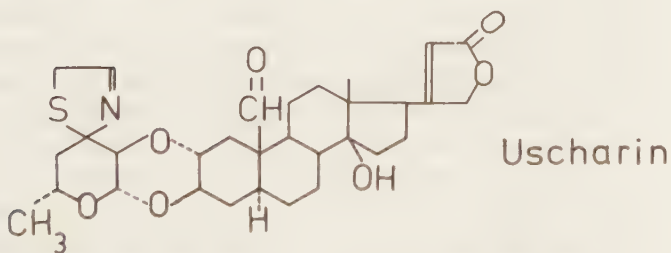
Ucharidin nach
Hesse und
Lettenbauer

Ucharidin
nach Hassal et al.



Ucharidin nach
Reichstein

Für das einen Thiazolinring enthaltende Ucharin
gilt demnach folgender Formelvorschlag:



Für diese Formel wird neben dem Befund des Massenspektrums und der Kernresonanz besonders das IR-Absorptionsspektrum von Uscharin angeführt, wo außer den Banden des Butenolidringes (1787, 1731 und 1626 cm^{-1}) und den Banden der Aldehydgruppe (2738 cm^{-1} und eine Schulter bei ca. 1710 cm^{-1}) eine deutliche Bande bei 1645 cm^{-1} auftritt, die der C=N-Schwingung des Thiazolinringes zugeordnet werden kann⁴³⁾.

Es waren nun nicht nur die durch die verschiedenen Strukturvorschläge aufgeworfenen Fragen, warum die Arbeiten über die herzwirksamen Glykoside der Calotropis-Arten wieder aufgenommen wurden. Diese Stoffe sind neuerdings in einer Untersuchung über Insektenabwehrstoffe durch T. Reichstein et al.⁴⁶⁾ interessant geworden.

So verstehen z. B. die Heuschrecke *Poekilocerus bufonius* K. und die Schmetterlinge *Danaus plexippus* L. und *Danaus chrysippus* die Cardenolide aus giftigen Asclepiadaceen (besonders *Calotropis procera*, *Pergularia tormentosa* und *Asclepias curassavica* L.) als chemische Waffe zu ihrer Verteidigung zu verwenden. Die Heuschrecke verspritzt bei der Abwehr ein Sekret, das mit Calactin und Calotropin aus der aufgenommenen pflanzlichen Nahrung angereichert ist. Die Schmetterlinge haben aus ihrem Raupenstadium noch so viele Cardenolide im Körper gespeichert, daß auch der ausgewachsene Falter noch für Vögel giftig und ungenießbar ist. Die Färbung des Falters wird so für die Vögel zur Warnfarbe. Weitergehende Untersuchungen haben gezeigt, daß sich die Warnfärbung wiederum andere, ungiftige Schmetterlinge "leihen" und so einen Schutz nach dem Täuschungssystem der klassischen Mimikry genießen. Dieses System funktioniert auch dann noch,

wenn gar nicht sämtliche Schmetterlinge des giftigen Vorbildes giftig und unschmackhaft sind. Es genügt durchaus, daß die Hälfte oder gar nur ein Viertel der Population an einem Giftkraut groß geworden ist und das Gift wirklich enthält⁴⁷⁾. Alle zitierten Untersuchungen, soweit sie sich auf die Calotropis-Glykoside beziehen, erstrecken sich ausschließlich auf die Inhaltsstoffe von Calotropis procera. Untersuchungen der Bestandteile der Pflanze Calotropis gigantea wurden bisher nur in indischen Arbeitskreisen durchgeführt^{48), 49), 50)}. Neben Wurzeln, Blüten, Blättern, Stengeln und Rinde wurde auch der Milchsaft (Latex) untersucht⁴⁹⁾. Neben Calciumoxalat und wasserdampf-flüchtigen Pflanzenharzen ("Resinole"), die als Äthyl- bzw. Isovalerian-Ester der Terpenalkohole α - und β - "Calotropeol" erkannt wurden, wiesen sie auch einen stickstoff- und schwefelhaltigen Stoff ("Gigantin") mit Herzgiftwirkung nach. Dieser Befund wurde später von Pitchandi⁵⁰⁾ bestätigt. Seitdem liegen keine weiteren Untersuchungen vor.

II. Verfahren zur Isolierung pflanzlicher Inhaltsstoffe

Allen angewandten Methoden liegt der Wunsch nach zerstörungsfreier Isolierung zugrunde. Das biologische Material sollte ohne Veränderung der Inhaltsstoffe aufgearbeitet werden. Bestimmte Veränderungen, wie Denaturierung mancher Eiweiße und Inaktivierung von Enzymen, werden in Kauf genommen. Letzteres wird manchmal sogar gewünscht, falls man eine Stabilisierung des Untersuchungsmaterials vor der eigentlichen Untersuchung anstrebt. Für die Aufstellung einer Bilanz der Pflanzeninhaltsstoffe gibt es bisher keinen ausgearbeiteten Analysengang. Man pflegt im allgemeinen zur Identifizierung unbekannter Stoffe in einem ersten Schritt eine Aufteilung des Untersuchungsmaterials in Fraktionen vorzunehmen (Petroläther-Auszug, Äther-Extrakt, Chloroform-Extrakt, Auszug mit absolutem oder 80%igen Alkohol, wässrige Auszüge). Der nach erschöpfender Auslaugung mit allen Extraktionsmitteln zurückbleibende unlösliche Anteil wird dann durch Hydrolyse oder andere drastischere Eingriffe aufgeschlossen und weiter zerlegt.

So wird z. B. für die Milchsäure-Aufarbeitung auf Inhaltsstoffe folgender allgemeiner Weg angegeben: Herstellung einer Stammlösung durch Aufnehmen des ursprünglichen Latex mit einem Chloroform-Alkohol-Gemisch. Versetzen der Stammlösung mit 96%igem Alkohol und Abfiltrieren. Danach dreimal mit 85%igem Alkohol nachwaschen und anschließend einengen. Nochmals mit 96%igem Alkohol behandeln und abfiltrieren. Mit frisch bereitetem Blei(II)-acetat und Bleihydroxid 15 Minuten energisch schütteln, den Niederschlag abfiltrieren und mit 50%igem Alkohol nachwaschen. Das Filtrat wird mit verdünnter Schwefel-

säure auf p_H 6 gebracht und danach im Vakuum eingeeengt. Danach wird dreimal mit Äther, fünfmal mit Chloroform und vierzehnmal mit Chloroform/Alkohol (2:1) ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird ebenfalls eingeeengt und diese wiederum nach obigem Schema aufgearbeitet⁵¹⁾.

Bei der Extraktion der Herzglykoside aus dem Milchsafte von *Calotropis procera* wurde im Arbeitskreis von G. Hesse³⁵⁾, 37) bisher so verfahren, daß der teilweise feste Bestandteile enthaltende Milchsafte zur Fällung der Eiweißstoffe mehrmals mit Äthanol behandelt wurde. Um hier nicht zu viele Herzglykoside einzuschließen, muß das erste Einrühren des Alkohols sehr sorgfältig und langsam erfolgen. Aus dieser wässrig-alkoholischen Lösung wurden dann zunächst mit Petroläther die Pflanzenharze extrahiert. Die Cardenolide sind hierin unlöslich. Nach möglichst sorgfältiger Entfernung der Pflanzenharze wird dann die Hauptmenge der Herzgifte mit Trichloräthylen ausgeschüttelt. Mit den nachfolgenden Extraktionen mit Chloroform und Chloroform-Alkohol-Gemischen werden die restlichen polaren Herzgifte extrahiert. Der anschließenden Auftrennung der einzelnen Extrakte in Cardenolide liegen ausschließlich chromatographische Verfahren zugrunde.

Alle diese Extraktionsverfahren sind umständlich und zeitraubend. Mit den mittlerweile fortgeschrittenen Analysenmethoden wurde hier nach einer neuartigen und schonenden Aufarbeitungsmethode gesucht. Es bot sich als mildestes Verfahren der Aufarbeitung wässriger Extrakte das Gefriertrocknungsverfahren an, das in den letzten Jahren immer häufiger zum Fixieren und Konservieren von biologischem Material und neuerdings auch bei der Fabrikation von Lebensmitteln verwendet wird⁵²⁾. Auch sehr empfindliche Pflanzenstoffe lassen

sich mit diesem rein auf physikalischer Basis beruhendem Verfahren ohne Veränderung der chemischen Zusammensetzung stabilisieren und für weitere Verarbeitung vorbereiten.

Die technisch-methodische Seite der Gefriertrocknung ist heute schon ziemlich weitgehend entwickelt. Es hat sich aber gezeigt, daß keine Standardmethode der Gefriertrocknung existiert. Die Trocknung soll dem durch das Gefrieren fixierten Zustand des biologischen Materials Dauerhaftigkeit verleihen, indem das Reaktionsmedium Wasser auf eine möglichst schonende Weise durch Vakuumsublimation entzogen wird. Die Proben temperatur muß hierbei knapp unter ihrem Schmelzpunkt gehalten werden. Der Kondensator arbeitet unter $- 30^{\circ}\text{C}$, wobei im gesamten System zur Erzielung optimaler Trocknungszeiten unter Vakuum von maximal 0,1 Torr gearbeitet wird. Eine Kühlung der Probe ist nach Beginn der Trocknung nicht mehr nötig, da sie durch den Entzug der Sublimationswärme ständig weiter abkühlt. Dem Trocknungsgut wird im Laufe der Vakuumsublimation zuerst das freie, meist in Form von Eiskristallen vorliegende Wasser entzogen; als zweites folgt das leichter gebundene Quellungswasser aus den Micellarräumen, und zuletzt wird das stöchiometrisch gebundene Wasser angegriffen. Ob eine Änderung der Trocknungsgeschwindigkeit den Erfolg einer Gefriertrocknung beeinflusst, ist noch wenig geklärt, die Erfahrung spricht aber eher für ein möglichst langsames Vorgehen. Zur Gefriertrocknung des Latex von *Calotropis gigantea* wurde eine selbstkonstruierte Apparatur verwendet, die im speziellen Teil beschrieben ist. Die Extraktion der gewünschten Stoffe aus dem getrockneten Milchsafte bereitet keine so großen Schwierigkeiten mehr wie aus dem wässrigen Lösungen, da das Wasser als Begleitsubstanz aller Extraktionen entfernt ist. Vor allem verringert sich das Volumen auf ein Zehntel.

III. Qualitative und quantitative Auftrennung der Herzglykoside

Bei der Durchführung der klassischen chemischen Trennungsmethoden stößt man bei der Auftrennung und Reindarstellung der Herzglykoside auf erhebliche Schwierigkeiten. Wegen der Empfindlichkeit der Stoffe und dem geringen Unterschied der Eigenschaften kommen hier ausschließlich chromatographische Verfahren in Frage.

Zur präparativen Auftrennung wird im wesentlichen die Adsorptionschromatographie aus Lösungen (LSC) angewandt. Als Adsorbens für die Säulen hat sich neben Aluminiumoxid vor allem das neutrale Kieselgel durchgesetzt. Da die Polaritätsunterschiede zwischen den einzelnen Herzgiften sehr groß sind, ist eine optimale Trennung nur mittels Gradientelution⁵³⁾ an einem vorgelegten Adsorptionsmittel möglich, wobei die Fließmittel nicht nur gereinigt, sondern auch äquilibriert sein müssen.

Zum qualitativen Nachweis wurde bisher fast ausschließlich die Papierchromatographie herangezogen, wobei zu Beginn der fünfziger Jahre die von Zaffaroni⁵⁴⁾ - ursprünglich für Steroidhormone - eingeführten Systeme mit Formamid- oder Propylenglykol imprägnierten Papieren verwendet wurden. Diese Systeme vom Zaffaroni-Typ mit Benzol, Benzol-Chloroform und Chloroform als mobile Phase wurden seit 1951 auch von der Reichsteinschen Arbeitsgruppe zur Chromatographie von Herzglykosiden mit Erfolg benutzt. Neben zahlreichen anderen Lösungsmittelgemischen haben auf diesem Gebiet in den letzten Jahren insbesondere die von Kaiser⁵⁵⁾ für die Digitalis-Glykoside entwickelten Systeme gute Erfolge erzielt.

Diese Systeme wurden notwendig, da einwandfreie Ergebnisse nach den üblichen Trennungsmethoden mit Wasser als stationärer Phase nur bei den wasserlöslichen Herzgiften von der Art der genuinen Strophantusglykoside erhalten werden. Alle übrigen nicht oder nur wenig wasserlöslichen Herzgifte benötigen zur papierchromatographischen Trennung die echte Verteilungschromatographie an Papier mit Formamid, Pentanol oder Octanol als stationäre Phase. Zur Untersuchung sind aber meist mehrere Fließsysteme notwendig, da die in den pflanzlichen Extrakten vorhandenen zahlreichen Glykoside recht unterschiedliche Löslichkeiten aufweisen. Die Papierchromatographie wurde hier aber mit fortschreitender Technik zugunsten der Dünnschichtchromatographie etwas zurückgedrängt. Nachdem nämlich Stoll⁵⁶⁾ auf die Leistungsfähigkeit von Silicagel-Säulen zur Trennung derartiger Gemische aufmerksam gemacht hat, war zu erwarten, daß der Übergang von der "geschlossenen" zur "offenen" Kieselgel-Schicht auf dem Gebiet der Steroid-Glykoside neben der Zeitersparnis eine verbesserte Trennung bei kleinerem Substanzbedarf bringen wird. Neben Spurenanalysen ist hier auch die Möglichkeit zur Trennung eines Gemisches im präparativen Maßstab gegeben. Außerdem hat man die Möglichkeit, aggressive Sprühreagentien zu verwenden, was bei der Papierchromatographie unmöglich ist. So kann hier zum Sichtbarmachen der Flecke nicht nur die Kedde-Reaktion⁵⁷⁾ mit alkalisch-äthanolischer 3,5-Dinitrobenzoesäure herangezogen werden, sondern auch das Liebermann-Burchard-Reagens⁵⁸⁾ (aus äthanolischer Schwefelsäure mit Acetanhydrid).

Gaschromatographische Trennungen können hier wegen der geringen Flüchtigkeit und der thermischen Instabilität der Komponenten nur in Spezialfällen verwendet werden.

C. SPEZIELLER TEIL

I. Inhaltsstoffe des Latex von *Calotropis gigantea*

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung der Herzgifte stand Milchsaft von *Calotropis gigantea* zur Verfügung. Dieser Latex wurde freundlicherweise von Dr. A. Zaman, Muslim University Aligarh, Bundesstaat Uttar Pradesh/Indien, zur Verfügung gestellt. Die Sendungen wurden durch Luftfracht nach Deutschland gebracht. Die erste bestand aus ca. 3 kg und die zweite aus ca. 6 kg Milchsaft. Zur Vermeidung von Artefaktbildung durch Bakterien oder Pilze war der Milchsaft in Polyäthylenflaschen (mit Gummistopfen) abgefüllt. Die Transportdauer betrug nach dem Warenbegleitschein maximal 4 Tage. Der Inhalt war von hellgrauer Farbe, dünnflüssig, über einem aus zähen Klumpen bestehenden Bodensatz von unangenehmem, aber charakteristisch lauchartigem Geruch. Zur Konservierung war eine nicht angegebene Menge Toluol beigemischt. Sofort nach der Ankunft wurde der Milchsaft tiefgefroren.

1. Aufarbeitung des Milchsaftes

Die bisherige Methode der Aufarbeitung war sehr umständlich und zeitraubend. Mit den üblichen Laborgeräten konnten nur 500 bis 1000 g Milchsaft auf einmal aufgearbeitet werden. Die erhaltenen Konzentrate bedurften zur Isolierung der Herzgifte dann noch einer zusätzlichen chromatographischen Trennung. Außerdem ist bei dieser Art der Aufarbeitung ein Durchschütteln mit Luft nicht auszu-

schließen. Viele Herzgifte sind aber autoxydabel. Es gelang z. B., gelöstes Calotropin am Licht durch Hindurchsaugen von Luft beinahe quantitativ in die Calotropin-19-carbonsäure überzuführen³⁴⁾.

So scheint die Suche nach einer schonenden Aufarbeitungsmethode angebracht, da nicht auszuschließen war, daß früher gefundene Herzgifte als Artefakte identifiziert werden.

Für die Konservierung des Milchsaftes wurde die bereits im allgemeinen Teil erwähnte Gefriertrocknung angewandt. Hier soll nur noch die apparative Seite beschrieben werden. Die erforderliche Apparatur (Abbildung I) wurde im hiesigen Institut angefertigt.

- Abbildung I siehe nächste Seite -

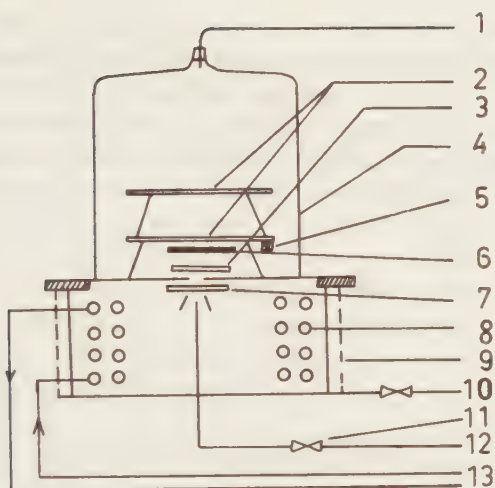


Abb. 1:

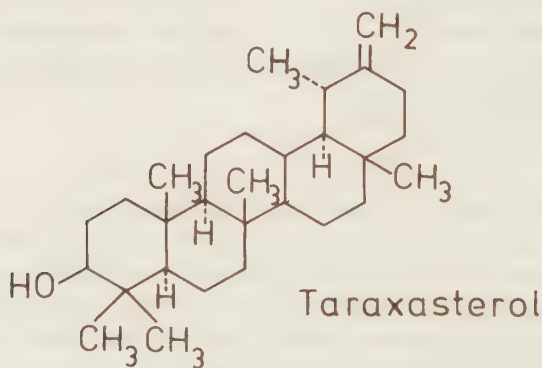
- | | |
|---|------------------------|
| 1 Vakuum-Messung | 8 Kondensatorschlangen |
| 2 Produkt-Stellplatten | 9 Abtau-Heizung |
| 3 Drossel-Ventil | 10 Kondensat-Ablauf |
| 4 Trocknungskammer | 11 Belüftungsventil |
| 5 Thermoelement | 12 zur Vakuumpumpe |
| 6 regulierbare Heizung | 13 zum Kälteaggregat |
| 7 Abweisblende, um Gasstrom zum Kondensator zu leiten | |

In obiger Apparatur wurde der Milchsaft in etwa 1 cm dicken Schichten in flachen Aluminiumschalen (25 cm Ø) eingefroren. Als Trockenkammer diente eine Glasglocke, die erlaubt, gleichzeitig zwei Schalen gefrierzutrocknen. Der Kondensator befand sich unterhalb der Trockenkammer. Seine Eiskapazität betrug etwa 700 g. Die Kühlung erfolgte durch Methanol von -50°C , das von einem Kryostaten durch die Kühlschlangen gepumpt wurde. Zur Erzeugung des Vakuums wurde eine Ölpumpe Balzer Duo 2

verwendet. Die Trocknungsdauer betrug durchschnittlich 36 Stunden pro Charge. Der Wassergehalt des Milchsaftes betrug 92 Gew.-% als Mittelwert aus 12 Chargen Milchsaft. Die erhaltene graubraune Masse ließ sich ohne Schwierigkeiten staubfein pulverisieren. Insgesamt wurden so 640,0 g Trockenmasse erhalten.

2. Identifizierung der Pflanzenharze

Von Hesse et al.¹⁷⁾ wurde aus dem Milchsaft von *Calotropis procera* ein kristallines Harz erhalten und als Gemisch von Triterpenestern (Amyrinen) beschrieben. Nach deren Verseifung wurde α -Lactuceryl (Schmp. 223 - 224 °C) als der zugrunde liegende Alkohol gefunden. Die Vermutung, daß α -Lactuceryl ähnlich dem Taraxasterol gebaut ist, wurde nach neuerer Literatur bestätigt^{59), 60)}. Danach ist α -Lactuceryl ein 18α , 19β H-Ursen-20(30)-ol(3 β), das mit Taraxasterol aus *Taraxacum officinale* (Löwenzahn) identisch ist:



Analog wurde hier vor der Isolierung der Herzgifte aus der Trockenmasse der Milch von *Calotropis gigantea* nach den in unpolaren, organischen Lösungsmitteln gut lös-

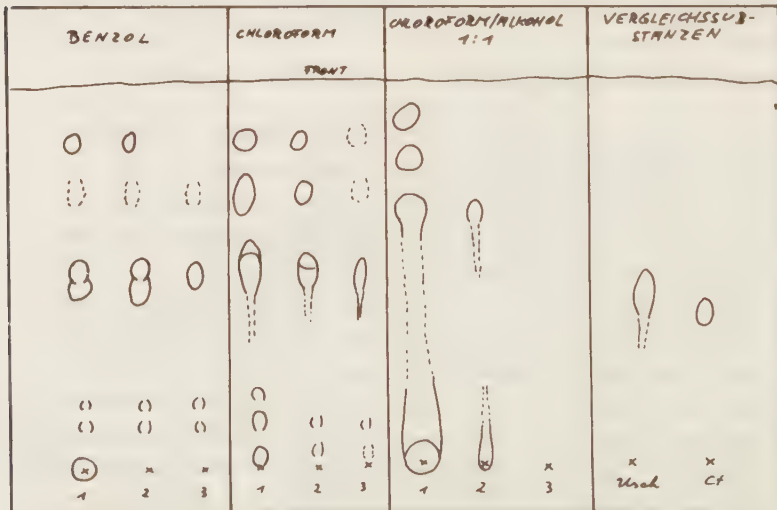
lichen Pflanzenharzen gesucht. Pro Charge Trockenmasse wurden 4 bis 6 Tage am Soxhlet mit Petroläther extrahiert. Bei 11 angesetzten Extraktionen (insgesamt 640 g Trockenmasse) wurden so nach Abzug des Lösungsmittels 176,5 g (= 27,5 Gew.-%) Pflanzenharze als zähe, schwach grünliche Masse erhalten. Es blieben somit 463,5 g herzigifthaltige Trockenmasse zurück. Das von Harzen befreite Milchsafkonzentrat fiel nicht wie bei den bisherigen Aufarbeitungsmethoden als braune, schmierige Masse an, die nur schwierig frei von Lösungsmitteln zu bekommen war, sondern als leicht pulverisierbare, rein weiße Substanz.

In einer vorausgegangenen Untersuchung⁶¹⁾ wurde ein chromatographischer und spektroskopischer Vergleich der Amyrine von *Taraxacum officinale*, *Calotropis procera* und *Calotropis gigantea* durchgeführt. Hierbei wurden die den Triterpenestern von *Calotropis procera* zugrunde liegenden Säuren (Essigsäure, Isovaleriansäure, Brenzterebinsäure) auch bei den Amyrinen von *Calotropis gigantea* gefunden. Als alkoholische Komponente wurde das Taraxasterol bestätigt.

Da auch eine lufttrockene Probe der Wurzeln von *Calotropis gigantea* (aus dem gleichen Ursprungsgebiet wie der Milchsaf) vorlag, wurden 296,4 g im Handmixer zerkleinertes Wurzelmaterial ebenfalls im Soxhlet in drei Portionen jeweils sechs Tage mit Petroläther extrahiert. Es wurden 4,1 g (= 1,4 Gew.-%) einer gelbgrünen Masse isoliert. Eine Aufarbeitung nach⁶¹⁾ und eine anschließende massenspektroskopische Untersuchung zeigte eine Übereinstimmung mit den aus dem Milchsaf isolierten Amyrinen. Die Molekülpeaks $M^+ = 522$ (Taraxterolbrenzterebat) $M^+ = 510$ (Taraxterolisovaleriat) und $M^+ = 468$ (Taraxterolacetat) konnten eindeutig zugeordnet werden.

3. Chromatographische Trennung der Herzgifte

Um die Herzgifte nach zunehmend polarem Charakter zu extrahieren, wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie nach einer Lösungsmittelfolge zur Extraktion gesucht. Eine Probe der von Amyrinen befreiten Trockensubstanz von *Calotropis gigantea* wurde mit Lösungsmitteln steigender Polarität extrahiert. Aus der eluotropen Reihe⁶²⁾ Tetrachlorkohlenstoff, Benzol, Äther, Trichloräthylen, Chloroform, Aceton, Alkohol wurde als bestes System zur vollständigen Extraktion gefunden: jeweils dreimalige Extraktion mit Benzol, Chloroform, Chloroform/Alkohol (1:1). Im dritten Chloroform/Alkohol-Extrakt und in einem anschließenden wässrigen Auszug wurden keine Herzgifte mehr nachgewiesen. Abbildung 2 zeigt die Dünnschichtchromatographie dieser Extraktionen.



Somit befindet sich das gesamte herzigifthaltige Material in obigen Extrakten. Hierbei zeigt sich aber, daß nicht alle Triterpene mit Petroläther extrahiert werden, sondern in den Extrakten immer noch in Spuren vorhanden sind. Sie sind an ihrer blauen bis grauen Farbreaktion mit Liebermann-Burchard-Reagens auf der Dünnschichtplatte zu erkennen und von den Herzgiften (hellbraune Flecke) zu unterscheiden.

Nach diesem Extraktionsschema wurden nun 240 g amyринfreie Trockensubstanz aus *Calotropis gigantea* mit der als optimal gefundenen Reihe Benzol, Chloroform und Chloroform/Alkohol (1:1) extrahiert. Auch hier waren der wässrige Extrakt und der Rückstand frei von Herzgiften. Die erhaltenen herzigifthaltigen Extrakte wurden nach dem schonenden Abzug der Lösungsmittel am Rotationsverdampfer weiter mit Hilfe der Säulechromatographie in die Bestandteile getrennt.

Da die dünnschichtchromatographische Untersuchung sehr verschieden polare Herzgifte in den Einzelextrakten zeigte, wurde für die säulenchromatographische Auftrennung die Gradientelution⁵³⁾ herangezogen. Um Artefaktbildung am Adsorbens während der Säulenchromatographie zu vermeiden, wurde anstelle des bei früheren Arbeiten verwendeten Aluminiumoxids stets Kieselgel verwendet. In eine Säule wurden stets 700 g Kieselgel (Woelm), desaktiviert mit 20 % Wasser, mit dem ersten Elutionsgemisch eingeschlämmt. Die Ausgangssubstanz wurde stets, auf dem Adsorbens niedergeschlagen, auf den Säulenkopf aufgegeben. Das Eluat wurde in einem Fraktionensammler in 140 ml-Fractionen aufgefangen. Die Zusammensetzung der einzelnen Fractionen wurde papier- und dünnschichtchromatographisch untersucht. Als Vergleichssubstanzen dienten Herzgifte, die in vorangegangenen Arbeiten in reiner Form isoliert worden waren. Das Eindampfen der einzelnen

Fractionen erfolgte im Vakuum, wobei Temperaturen von 40 °C niemals überschritten wurden. Als Beispiel für die Auftrennung soll das in Abbildung 3 aufgezeichnete Elutionsdiagramm des Chloroform/Alkohol-Extraktes dienen. Da hier hauptsächlich polare Herzgifte zu erwarten waren, wurde die Gradientelution gleich mit Chloroform begonnen.

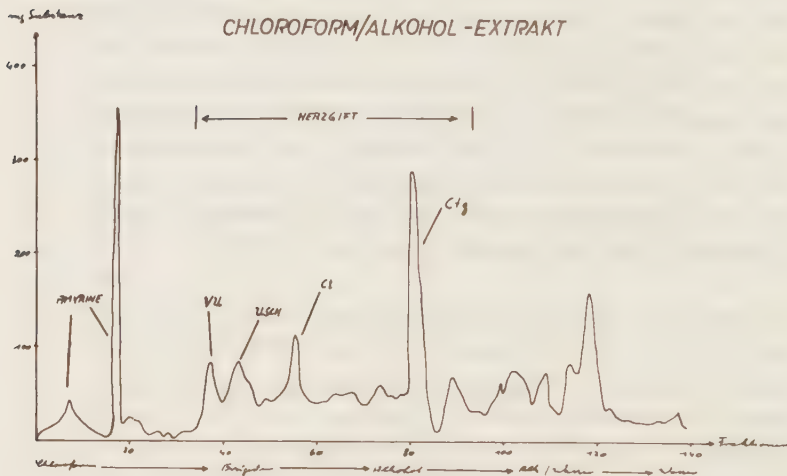


Abb. 3

Bei den drei Herzgift-Extraktionen tauchten zu Beginn der Trennung in jedem Fall Spuren von Amyrinen auf. An Herzgiften wurden Voruscharin (amorph), in reichlicher Menge Uscharin (krist.), Calotropin (teilweise krist.) und in Spuren Calotropagenin identifiziert. Die in unserem Arbeitskreis bei der Aufarbeitung des Milchsafte von *Calotropis procera* zusätzlich gefundenen Herzgifte Calactin und Calotoxin traten nicht auf. Bei dem von

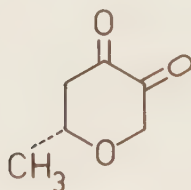
G. Ludwig³⁷⁾ als Calotropin-19-carbonsäure identifizierten Calotoxin dürfte es sich somit um ein durch Autoxydation während des langen Transports, der Lagerung und der weniger schonenden Aufarbeitung entstandenen Artefakt handeln. Bei dem mit Calotropin ($C_{24}H_{40}O_9$)raumisomeren Calactin dürfte es sich um ein leicht zu bildendes Umlagerungsprodukt handeln (Isomerisierung an C'-2). Die von T. Reichstein⁴³⁾ im Latex von *Calotropis procera* zusätzlich gefundenen Herzgifte Uzarigenin, Syriogenin und das neue Glykosid Procerosid wurden im Latex von *Calotropis gigantea* nicht gefunden. Die genannten Autoren geben an, ihr Latex hätte sehr unter dem Transport gelitten. Eine Artefaktbildung ist auch hier nicht ausgeschlossen. Nach Hassal^{40), 41)} soll bei der Chromatographie von *Calotropis*-Herzgiften am Adsorbens aus Uscharidin die Calactinsäure ("Boraxsäure" nach Lettenbauer³⁴⁾) entstehen, die mit wässriger 5%iger Bicarbonatlösung zu eluieren ist. Deshalb wurde nach Elution der letzten Herzgifte die Säule mit Alkohol/Wasser und 5%iger Bicarbonatlösung gewaschen. Es konnte in keinem Fall die von Hassal postulierte Boraxsäure gefunden werden.

Für weitere Untersuchungen stand nun genügend Ausgangsmaterial zur Verfügung.

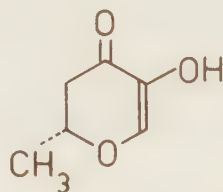
II. Untersuchungen zur Glykosidstruktur

1. Brenzungsprodukte des Calotropins

Der von Reichstein et al.⁴⁵⁾ durchgeführte Struktur-
beweis für das Calotropagenin ergab nun in Verbindung
mit der bei Brenzungsversuchen an Calotropin bzw.
Calactin³⁵⁾ erhaltenen "Herzgiftmethylreduktinsäure"
(HMRS) neue Vorschläge für die Glykosidstruktur und
die Verknüpfung des Glykosids mit dem bei allen Calo-
tropis-Cardenoliden gleichartigen Genin. Für die HMRS
($C_6H_8O_3$, Fp. 83,5 °) schlagen Crout et al.^{63), 64)}
ein Methylpyrandion [I] vor. Aus dieser Struktur sind
aber die saure Reaktion und die Blaufärbung mit $FeCl_3$
nicht zu erklären. Eine enolisierte Struktur [II]
ist sicher zutreffender.



I



II

Das durch thermische Abspaltung aus Calotropin erhal-
tene Fragment II wird auch im Massenspektrum des Herz-
giftes beobachtet ($m/e = 128$ stark). Abbildung 4 zeigt
das Massenspektrum von Calotropin, das im Fragmentie-
rungsschema große Ähnlichkeit mit dem Calactin⁴⁵⁾ auf-
weist.



Abb. 4

Massenspektrum von Calotropin, isoliert aus *Calotropis gigantea*.

Schmp. des Präparats 219 bis 220 °C. Direkt-Einlaßsystem, 140 °C.

Versuchsweise Zuordnung der Fragmentierung: $M^+ = 532$ (s. schwach),

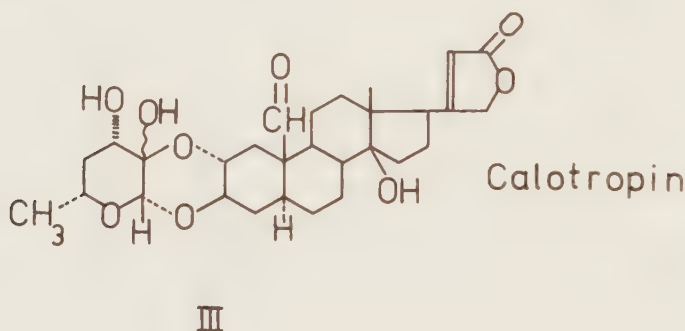
$$514 = 532 - \text{H}_2\text{O}; 496 = 514 - \text{H}_2\text{O}; 481 = 496 - \text{CH}_3; 470 = 514 - \text{CO}_2; 468 = 496 - \text{CO};$$

404 = G (Genin) = 532 - 128; 386 = G - H₂O; 374 = G - CHO; 368 = 386 - H₂O;

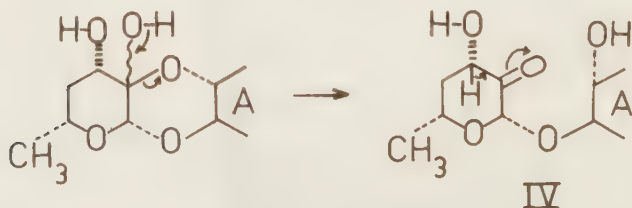
358 = 386 - CO; 350 = 368 - H₂O; 340 = 358 - H₂O; 325 = 340 - CH₃; 322 = 340 - H₂O;

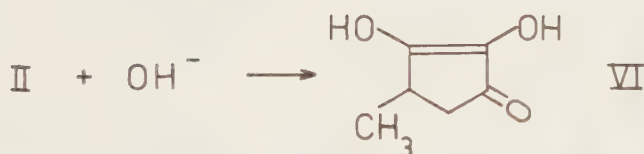
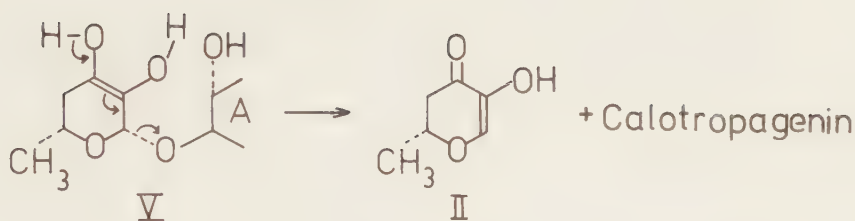
307 = 322 - CH₃; 279 = 307 - CO; 128 = Herzgiftmethylreduktinsäure

Da für das Genin zwei sekundäre OH-Gruppen in 2 α - und 3 β -Position gesichert sind, wird von Reichstein et al.⁴⁵⁾ beim Calotropin eine Halbacetalbildung über C-2 des Genins und eine Ätherartige Bindung über C-3 des Genins zum Glykosid vorgeschlagen. Als endgültiges Formelbild für Calotropin ergibt sich dann [III].



Die Bildung der HMRS aus der thermischen Spaltung und bei der massenspektrometrischen Fragmentierung läßt sich dann so verstehen, daß der Halbacetalring im Calotropin zuerst geöffnet wird und die entstehende Ketoform [IV] über ihr Enol [V] in Calotropagenin und [II] übergeht:





Die weitere Umlagerung der optisch aktiven HMRS mit Lauge zur optisch inaktiven Methylreduktinsäure (Schmp. 70° / 90° C) [VI] wurde von Hesse et al.³⁵⁾ untersucht und durch Synthese²²⁾ bestätigt. Eine massenspektroskopische Untersuchung der reinen HMRS stand noch aus. Für einen Brenzversuch von Calotropin aus dem Milchsaft von *Calotropis gigantea* wurde die in ³⁵⁾ beschriebene Apparatur insoweit verbessert, als es hier möglich war, die kristalline HMRS sofort nach dem Brenzen mit Lösungsmittel unter Inertgas herauszuwaschen und die unzersetzte Substanz möglichst schnell ins Massenspektrometer einzugeben. Die Wärmeübertragung zwischen heißem Bad und Substanz wurde mit

Hilfe von Glasperlen verbessert. Die so aus Calotropin bei 230 °C Ölbadtemperatur und 0,01 Torr erhaltene HMRS bestätigt das Molekulargewicht von 128. Das vorgeschlagene Fragmentierungsschema ist aus Abb. 5 zu entnehmen.

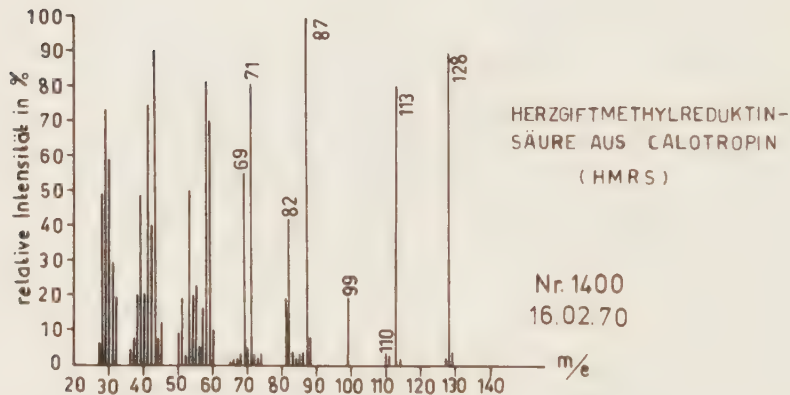


Abb. 5: Massenspektrum der kristallinen Herzgift-
methylreduktinsäure

Schmp. des Präparats: 83 °C

Direkt-Einlaß, Temperatur 30 °C

Versuchsweise Zuordnung: $M^+ = 128$; $113 = 128 - \text{CH}_3$;
 $110 = 128 - \text{H}_2\text{O}$; $99 = 128 - \text{CHO} (?)$; $87 = 113 - \text{H}_2\text{C}_2$;
 $82 = 99 - \text{OH}$; $81 = 99 - \text{H}_2\text{O}$; $71 = 113 - \text{CH}_2\text{CO}$;
 $69 = 87 - \text{H}_2\text{O}$.

Ein Vergleich der massenspektrometrischen Fragmentie-
 rung der später synthetisierten Methylreduktinsäure
 (Abb. 6) zeigt keinerlei Übereinstimmung mit der

krist. HMRS. Dies ist zugleich ein weiterer Beweis dafür, daß das carbocyclische System der Methylreduktinsäure ursprünglich im Herzgift nicht vorhanden ist.

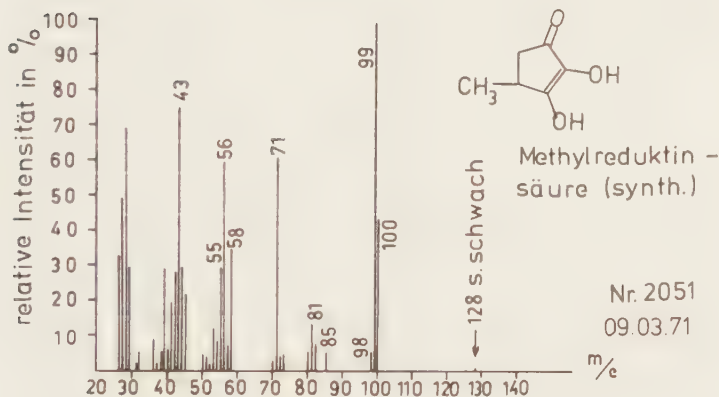


Abb. 6: Massenspektrum der synthetischen Methylreduktinsäure (Schmp. 70° , aus Benzol).

Direkt-Einlaßsystem, Temperatur 30°C

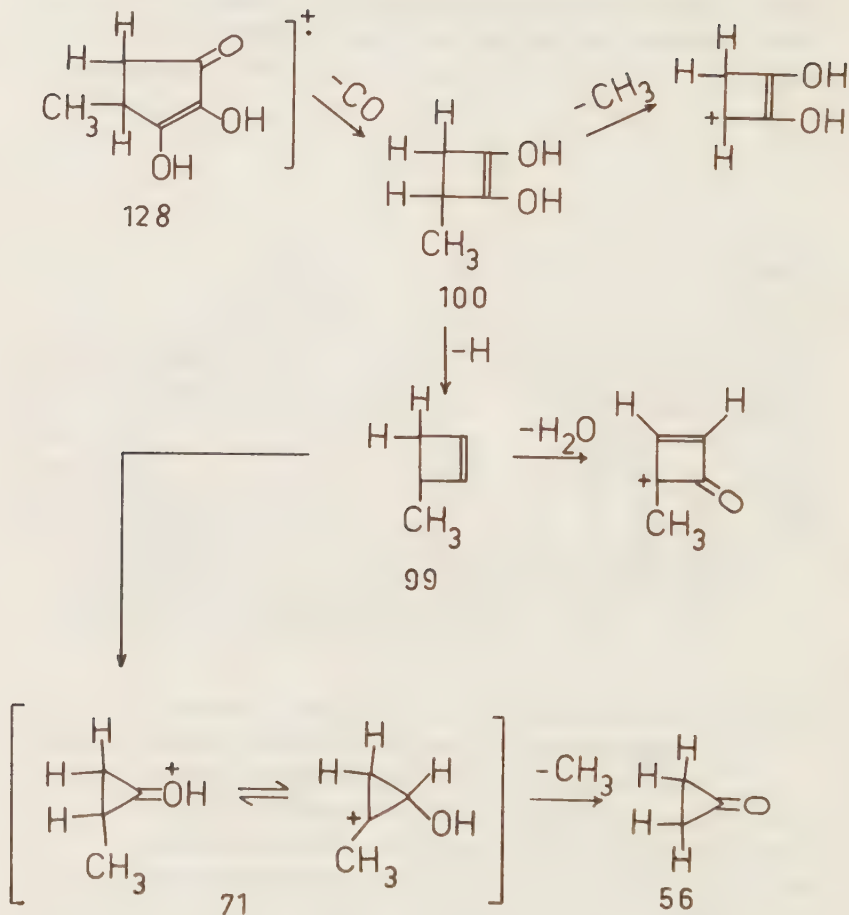
Versuchsweise Zuordnung: $M^+ = 128$ (sehr schwach);

$113 = 128 - \text{CH}_3$ (schwach); $111 = 128 - \text{OH}$;

$99 = 128 - \text{HCO}$; $82 = 100 - \text{H}_2\text{O}$; $81 = 99 - \text{H}_2\text{O}$;

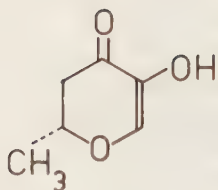
$71 = 99 - \text{CO}$.

Zerfallsschema:

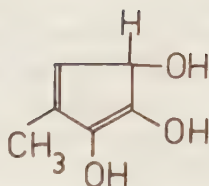


Diese Methode der Brenzung von Calotropin ist für organische Substanzen und erst recht für das relativ empfindliche Cardenolid-Gerüst eine recht harte Methode. Es ist daher nicht auszuschließen, daß die durch Brenzung entstandene HMRS ein bei der Ölbadtemperatur von 230 bis 250 °C entstandenes Artefakt ist.

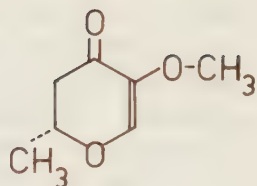
Die bislang veröffentlichten Gesamtstrukturen sind deshalb nur Vorschläge, wobei zwar die Genin-Struktur gesichert ist, aber die Glykosid-Struktur im ursprünglichen Molekül nur durch die Abspaltung eines "Zuckers" der Masse 128 bei den oben erwähnten Brenzversuchen, durch massenspektroskopische Vergleiche mit den in der Struktur gesicherten Cardenoliden Gomphosid und Afrosid und durch Interpretation der UV- und IR-Spektren wahrscheinlich gemacht wird. Da der Glykosidrest bei der Darstellung von β -Tetrahydrouscaridin wegen der positiven Osazonprobe auf Methylreduktinsäure¹⁷⁾ und wegen der auch hier im Massenspektrum deutlichen Spitzen bei $m/e = 128$ und $m/e = 113$ ⁴⁵⁾ noch intakt sein muß, kann die Ketogruppe an C-2' nicht frei vorliegen. Für eine maskierte Form als Halbacetat mit der 2α -OH-Gruppierung des Genins spricht, daß das C-2' selbst bei dem Versuch der Reduktion der vermeintlichen Carbonylgruppe mit LiAlH_4 (im Überschuß) in siedendem THF nicht reduziert wird. LiAlH_4 verändert hier zwar die Aldehydgruppe und den Butenolidring am Genin, der Glykosidrest bleibt aber im wesentlichen unverändert. Der neue Strukturvorschlag [II] der HMRS als Derivat des γ -Pyrons würde auch die bislang offenen Fragen klären, warum bei der Umsetzung der HMRS mit Diazomethan nur ein Monomethyläther isoliert werden kann und warum dieser Monomethyläther weder in wässriger noch in methanolischer Lösung eine $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cl}_3$ -Reaktion gibt. Bei der ursprünglich angenommenen Struktur [VII] der HMRS als Isomeres der Methylreduktinsäure³⁵⁾ wären bei der Umsetzung mit Diazomethan theoretisch zwei isomere Monomethyläther und ein Dimethyläther zu erwarten. Die Isolierung eines definierten Monomethyläthers spricht ebenfalls für die Struktur [II], wobei dann der Monomethyläther die Struktur [VIII] erhalten würde.



II



VII



VIII

Daß [VIII] dann keine $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cl}_3$ -Reaktion mehr geben wird, ist ebenfalls aus der Struktur zu ersehen, denn eine enolisierte Hydroxylgruppe ist hier nicht mehr vorhanden.

Um diese Glykosidstruktur endgültig zu beweisen, wurde versucht, den glykosidischen Anteil der Calotropis-Herzgifte durch eine mildere Methode der Abspaltung zu erfassen, um so die Gesamtstruktur der ursprünglichen Calotropis-Glykoside zu sichern.

2. Ätherspaltungen mit Mg Cl_2

Für die beiden Verknüpfungsstellen zwischen Genin und Glykosid wird bei den Calotropis-Cardenoliden eine Halbacetalgruppierung über C-2 des Genins und eine Ätherbrücke über C-3 postuliert. Die Besonderheit dieser Verknüpfung verursacht das für Calotropis-Glykoside anormale Verhalten gegen Säuren und Laugen. Während normale Glykoside gegen Laugen weitgehend beständig sind und von Säuren relativ leicht gespalten werden, liegen die Verhältnisse hier umgekehrt. Das hier mit Laugen erhaltene Spaltprodukt ist aber meist ein im alkalischen Medium umgelagertes Produkt. Ein Rückschluß

auf die ursprüngliche Struktur ist also durch eine derartige Spaltung nicht möglich. So wurde hier neben der pyrolytischen Spaltung nach einem neuen Weg zur schonenden Glykosid-Abspaltung gesucht.

Da die stabilste Bindung zwischen Genin und Glykosid erfahrungsgemäß die Ätherbrücke darstellt, waren hier die verschiedensten Möglichkeiten der Ätherspaltung zu diskutieren.

Bislang wurden in einer außerordentlich großen Zahl von Veröffentlichungen verschiedenste Methoden und Reagenzien zur Spaltung von Äthern beschrieben. Dies zeigt aber, daß auch heute noch die Ätherspaltung häufig eine recht problematische Reaktion darstellt, bei der ständig nach neuen Verfahren gesucht werden muß. Eine einfache Spaltung der C-O-C-Bindung ohne zusätzliche Reaktionspartner wurde schon sehr frühzeitig versucht. Sie verläuft grundsätzlich bei sehr hohen Temperaturen^{65), 66)}. Das käme den energischen Bedingungen der Pyrolyse gleich. Dieses Verfahren kann hier also nicht in Betracht gezogen werden. Ebenso kommt keines der Verfahren in Frage, die in den Übersichtsartikeln von Burwell⁶⁷⁾ und Meerwein⁶⁸⁾ erwähnt sind. Die hier angeführten Ätherspaltungen sind entweder wegen der drastischen Reaktionsbedingungen oder wegen dem p_H -Wert des Reaktionsmediums ungeeignet. Außerdem sind hier in dem mit verschiedenen funktionellen Gruppen versehenen Steroidgerüst Nebenreaktionen nicht auszuschließen. Erst in neuerer Literatur finden sich Hinweise auf mildere Spaltungen von Ätherbindungen im geeigneten Reaktionsmedium. So wurden gute Ausbeuten bei der Spaltung aliphatischer und cycloaliphatischer Äther mit gemischten Sulfonsäure-carbonsäureanhydriden erhalten⁶⁹⁾. Tetrahydrofuran wird so z. B. durch Acetyl-p-toluolsulfonat oder Acetylmethansulfonat, die beide gut zugänglich sind, bei Zimmertemperatur fast quantitativ gespalten. Für die Spaltung von Alkylcycloalkyl-

Äthern, wie sie z. B. in Steroidäthern vorliegen, wird eine schonende Methode der Spaltung mit Bortrifluorid bei Gegenwart von Lithiumbromid bei Raumtemperatur in Acetanhydridlösung angegeben⁷⁰⁾. Neben milden Ätherspaltungen mit Diboran und Jod⁷¹⁾, Bortrijodid⁷²⁾ oder Aluminiumchlorid⁷³⁾ war auch der Hinweis interessant, daß Oestronmethyläther durch Lithiumjodid glatt gespalten wird⁷⁴⁾. Oestronäthyläther reagiert ebenfalls, jedoch langsamer. Diese Reaktion ist auch ohne Lösungsmittel durch einfaches Erhitzen des Äthers mit $\text{LiJ}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ durchgeführt worden.

Bei diesen Ätherspaltungen werden also neuerdings in zunehmendem Maße anorganische Halogenide verwendet, wobei wahrscheinlich der Lewis-Säurecharakter bei den Bor- und Aluminiumhalogeniden für die milde Ätherspaltung, speziell bei Steroidäthern, ausschlaggebend ist. Für die Einordnung der Lithiumhalogenide und der durch die Schrägbeziehung verwandten Magnesiumhalogenide als Lewis-Säuren ergeben sich Schwierigkeiten, da letzteren die für Lewis-Säuren charakteristischen Elektronenlücken fehlen. Die in letzter Zeit sehr aktuell gewordene erweiterte Säure-Base-Definition von R.G. Pearson⁷⁵⁾ ist bei der Betrachtung der Magnesiumhalogenide konsequenter. Dieses Prinzip der "hard and soft acids and bases" ist in der angelsächsischen Literatur schon weit verbreitet und wird dort vielfach als HSAB-Konzept bezeichnet. Diesem Konzept liegt neben der Berücksichtigung der Elektronegativität, die ein Maß für die Tendenz eines Atoms ist, Elektronen in kovalenter Bindung anzuziehen, die Polarisierbarkeit eines Atoms oder Moleküls zugrunde, die ein Maß für die Reaktivität von Molekülen ist. So reagiert z. B. ein leicht polarisierbares Molekül mit einem elektrophilen Reaktionspartner leichter als ein wenig polarisierbares. Die Lewis-Säuren (Elektronen-acceptoren) werden nach diesem Modell in zwei Gruppen

eingeteilt. Die Säuren der einen Gruppe bilden stabile Bindungen mit solchen Basen, die weniger gute Protonenacceptoren, aber leicht polarisierbar sind, wie z. B. die Übergangsmetalle mit abgeschlossener oder nahezu abgeschlossener d-Schale. Die andere Gruppe bildet stabile Bindungen mit Basen, die starke Protonenacceptoren, aber wenig polarisierbar sind, also z. B. mit der "klassischen" Base OH^- . Die Elektronenacceptoren der letzteren Gruppe werden als "hart" bezeichnet. Dazu gehören neben dem Proton auch die Alkali und Erdalkalitionen.

3. Girard-Spaltung von Uscharin

Es waren nun entsprechende Mengen von reinen Cardenoliden als Ausgangsmaterial für Spaltungsversuche erforderlich. Es konnte nicht auf das bei der Pyrolyse verwendete Calotropin zurückgegriffen werden, da hier keine Spaltung erreicht werden konnte, sondern auf das aus dem Latex von *Calotropis gigantea* isolierte Hauptherzgift Uscharin. Da dieses Cardenolid am Glykosidrest aber noch einen Thiazolinring besitzt, mußte dieser zuerst abgespalten werden. Falls man dafür sehr reines Ausgangsmaterial zur Verfügung hat, läßt sich dies durch eine mit HgCl_2 katalysierte Hydrolyse erreichen²¹⁾. Der Δ 3-Thiazolinring läßt sich aber auch mit Carbonylreagenzien abspalten. Dazu kann das von T. Reichstein in die Herzgiftchemie eingeführte Girard T verwendet werden⁷⁶⁾. Die entstehende Girardverbindung läßt sich zum Uscharidin hydrolysieren. Für diese Methode kann auch unreines Uscharin verwendet werden.

Eine Ausbeute von 75 % konnte hier dadurch erreicht werden, daß das in einem ersten Ansatz nicht umgesetzte Uscharin nochmals mit einem Überschuß an Girard T umgesetzt wurde. Eine Reaktionskontrolle erfolgte mit Hilfe der Papier- und Dünnschichtchromatographie. Abb. 7 zeigt das Ergebnis der Dünnschichtchromatographie an Kieselgel nach der Entwicklung mit Liebermann-Burchard-Reagens. Zur Kontrolle sind zwei verschiedene Konzentrationen je Probe aufgetragen.

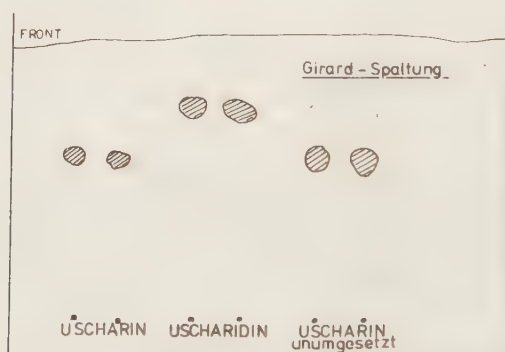


Abb. 7: Dünnschichtchromatographie der Girard-Spaltung von Uscharin

Laufmittel: Cyclohexan/Essigester/n-Propanol (25:65:10).

Entwicklung mit Liebermann-Burchard-Reagenz, Platte

10 min auf 110 °C erwärmt.

Aus der eingedampften wässrigen Lösung des ersten Ansatzes wurden neben Resten Girard T noch Mercaptoacetaldehyd, bzw. sein Oxydationsprodukt, das Disulfid, nachgewiesen. Mit Jod kann quantitativ oxydiert werden und das DNP des Disulfids ausgefällt werden. Das isolierte Uscharidin kann aus Chloroform in großem Überschuß oder aus Chloroform/Alkohol (9:1) umkristallisiert werden.

4. Mg Cl_2 -Spaltung von Uscharidin

Von den zur Verfügung stehenden "harten Säuren" zeigte ein Spaltungsversuch mit wasserfreiem Magnesiumchlorid in absolutem Methanol eine eindeutige Reaktion. Nach 24stündigem Rühren bei Raumtemperatur war das ursprünglich eingesetzte Uscharidin fast völlig verschwunden. Die klare Lösung hat sich nach dieser Zeit wieder wie in den ersten Stunden der Reaktion milchig getrübt. In der dünnschicht-kontrollierten Reaktion zeigte sich eine neue, einheitliche Verbindung. Die positive Kedde-Reaktion dieser Verbindung läßt darauf schließen, daß bei diesem Stoff die Lacton-Gruppierung am Genin intakt ist und infolgedessen die Geninkomponente des Cardenolids in den wichtigsten Funktionen weiter besteht. Eine Veränderung am Genin im Hinblick auf die für die Herzwirksamkeit verantwortlichen Funktionen war bei diesen milden Reaktionsbedingungen auch nicht zu erwarten. Die Reaktionslösung wurde nach beendeter Reaktion in eine wässrige und eine organische Phase (Chloroform) aufgetrennt, um so das eventuell abgespaltene Glykosid vom restlichen Herzgift zu trennen. In 1 mmol-Ansätzen (530 mg Uscharidin) mit $\text{MgCl}_2 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ im Überschuß (500 mg = 4 mmol) wurden so nach der Aufarbeitung aus der organischen Phase zwischen 405 und 419 mg farbloses mikrokristallines Material gewonnen, das eine eindeutige Kedde-Reaktion zeigte. Da in der wässrigen Phase das abgespaltene Glykosid vermutet wurde, bei dem Luftempfindlichkeit und Umlagerungen bei normaler Aufarbeitung nicht ausgeschlossen werden können, wurde die wässrige Phase sofort eingefroren und zusammen mit dem darin gelösten Magnesiumchlorid, bzw. dessen Hydrolysenprodukten der Gefriertrocknung unterworfen. Die Bedingungen waren die gleichen wie bei der Gefriertrocknung des Milchsafte

von *Calotropis gigantea*. Es wurden zwischen 603 und 615 mg eines weißen, amorphen Produktes isoliert. Die Kedde-Reaktion war hier in allen Fällen negativ. Abb. 8 zeigt das Ergebnis der MgCl_2 -Spaltung von Uscharidin auf Kieselgel.

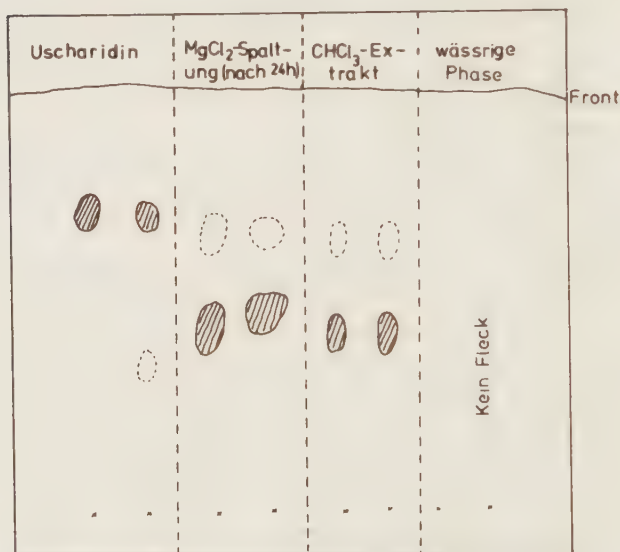


Abb. 8: Dünnschichtchromatogramm der MgCl_2 -Spaltung von Uscharidin in absolutem Methanol.

Laufmittel: Cyclohexan/Essigester/n-Propanol (25:65:10)

Entwicklung mit Liebermann-Burchard-Reagens, Platte 10 min auf 110 °C erwärmt.

Untersuchung des Reaktionsproduktes aus der organischen Phase:

Das Dünnschichtchromatogramm des Rückstandes der organischen Phase zeigt noch geringe nichtumgesetzte Mengen Ucharidin. Dadurch ist auch ein Massenspektrum der rohen Probe schwer zu interpretieren. Eine Reinigung wurde an einer Kieselgelsäule (Aktivität IV) mit Chloroform als Anfangselutionsmittel erreicht. Mit steigender Zumischung von Essigester wurden bei 800 mg eingesetzter Substanz 120 Fraktionen eluiert, dünn-schichtchromatographisch untersucht und identische Fraktionen zusammengefaßt. Die zusammengefaßten Fraktionen IX und X waren reines kedde-aktives Spaltprodukt. Eine papierchromatographische Untersuchung auf Reinheit ergab mit verschiedenen Laufmitteln jeweils nur einen Fleck.

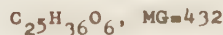
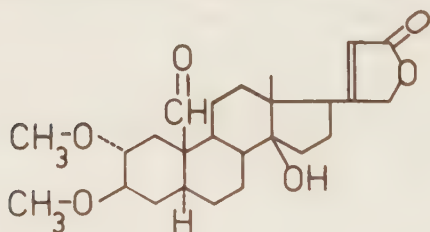
Abb. 9 zeigt das Dünnschichtchromatogramm der zusammengefaßten Fraktionen auf Kieselgel.



Abb. 9: Dünnschichtchromatogramm der zusammengefaßten Fraktionen der Säulenchromatographie des Rückstandes der organischen Phase

Laufmittel: Cyclohexan/Essigester/n-Propanol (25:65:10)
Entwicklung mit Liebermann-Burchard-Reagens, Platte 10 min auf 110 °C erwärmt.

Der Rückstand der zusammengefaßten Fraktionen IX und X war farblos und mikrokristallin. Für die optische Drehung in Äthanol wurde ein Wert von $\alpha_D^{18} = -30,1 \pm 3,0^\circ$ gefunden. Der Schmelzpunkt der Verbindung beträgt 207°C . Die in der Verbrennungsanalyse gefundenen Werte stimmen mit dem ursprünglich vermuteten Calotropagenin nicht überein. Auch der im Massenspektrum der Verbindung gefundene Molekülpeak 432 liegt um 28 Masseneinheiten höher als das Genin. Bei der Annahme, daß das Lösungsmittel bei der Abspaltung des Glykosids mit eingegriffen hat, ist die Bildung des Calotropagenindimethyläthers IX wahrscheinlich. Die gefundenen Analysenwerte stehen in sehr guter Übereinstimmung mit der Verbindung $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_6$. Für diese Struktur spricht auch ein scharfes Signal bei 3,58 ppm



IX

im Protonenresonanzspektrum für eine Methoxygruppierung am C-2 bzw. C-3 des Genins (Abb. 10). Dieses Signal tritt im Protonenresonanzspektrum des Uscharidins nicht auf⁴⁵⁾. Für die Verbindung IX ist auch die Fragmentierung im Massenspektrum (Abb. 11) ohne Schwierigkeiten zu interpretieren.

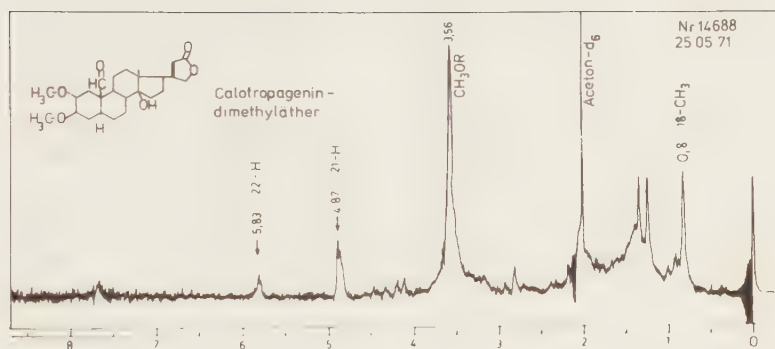


Abb. 10: Protonenresonanzspektrum von Calotropagenin-dimethyläther in D-Aceton mit versuchsweiser Zuordnung

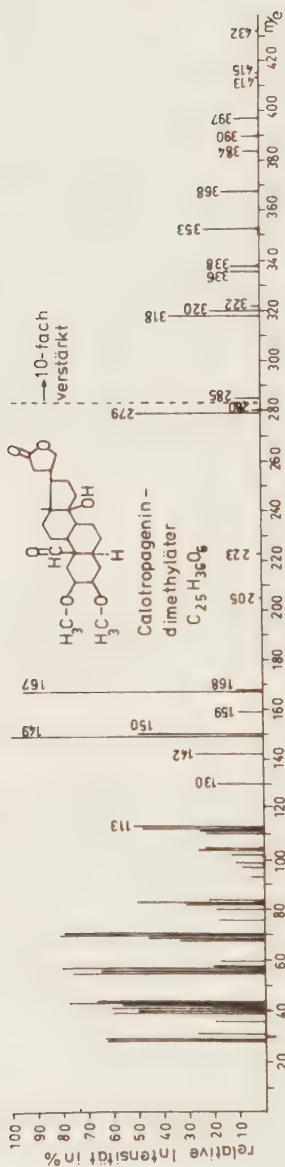


Abb. 11: Massenspektrum des Calotropagenindimethyläthers; Schmp. 207 °C, HTE 150 °C.

Versuchsweise Zuordnung: M^+ = 432 (sehr schwach); 415 = M - OH; 413 = M - H₂O;

397 = 415 - H₂O; 390 = M - CH₂O (?); 384 = 415 - OCH₃; 368 = 397 - CHO; 353 = 368 - OCH₃,

338 = 353 - CH₃; 336 = 353 - OH; 318 = 336 - H₂O.

Daß in der Verbindung IX tatsächlich neben dem Butenolidring nur noch eine Carbonylfunktion vorhanden ist, zeigt das UV-Spektrum (Abb. 12). Neben dem Butenolidmaximum bei 228 m μ mit $\log \epsilon = 3,29$ ist ein schwaches Nebenmaximum bei 290 m μ mit $\log \epsilon = 1,66$ ein deutlicher Hinweis auf eine Aldehydgruppe, da gesättigte Ketone und Aldehyde im Bereich 275 bis 295 m μ eine schwache, aus Symmetriegründen verbotene Bande zeigen. Diese wird durch Anregung des einsamen Elektronenpaares am Sauerstoff in das antibindende π^* -Orbital der Carbonylgruppe verursacht⁷⁷⁾. Die gefundenen Werte stehen auch in relativ guter Übereinstimmung mit den für Calotropagenin veröffentlichten Werten ($\lambda_{\max 1} = 218$ m μ , $\log \epsilon = 4,1$ für den Butenolidring; $\lambda_{\max 2} = 308$ m μ , $\log \epsilon = 1,54$ für die Aldehydgruppe)³⁰⁾.

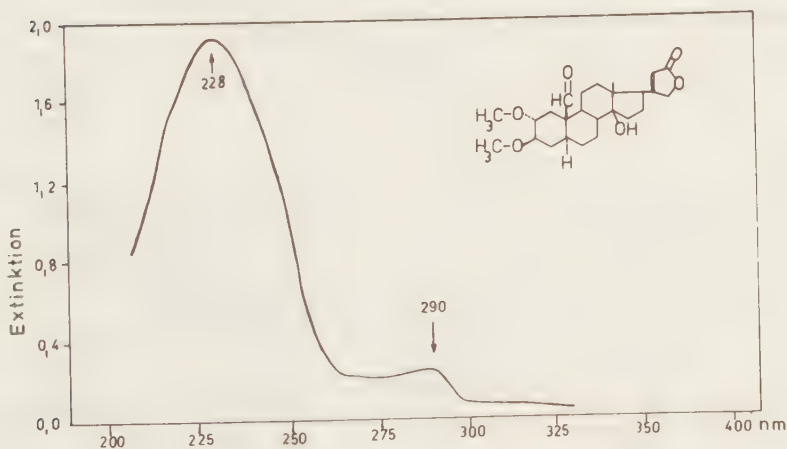


Abb. 12: UV-Absorptionsspektrum von Calotropagenin-dimethyläther in Äthanol
(Maxima berechnet auf C₂₅H₃₆O₆)

In diesem Zusammenhang war nun zu erwarten, daß bei der Lösungsmittelabhängigen Spaltung des Uscharidins mit MgCl_2 in Methanol (abs.) der Übergang zum nächsthöheren Alkohol als Reaktionsmedium die Einführung von entweder einer oder zwei Äthylgruppen an das Genin bringen sollte. Das konnte bestätigt werden. Unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie bei der Spaltung in Methanol wurden 530 mg Uscharidin (1 mmol) in absolutem Äthanol zur Umsetzung gebracht. In der dünnschicht- und papierchromatographischen Kontrolle konnte festgestellt werden, daß das ursprünglich eingesetzte Uscharidin nach 24stündigem Rühren bei Raumtemperatur zugunsten einer neuen kedde-aktiven Verbindung umgesetzt wurde. Aus dem Papierchromatogramm (Abb. 13) ist zu ersehen, daß wiederum ein Spaltprodukt mit herzkaktiver Wirkung entstanden ist, das aber einen größeren R_f -Wert als das Produkt der Spaltung in Methanol besitzt ($R_f \text{ MeOH} \approx 0,18$, $R_f \text{ EtOH} \approx 0,25$).

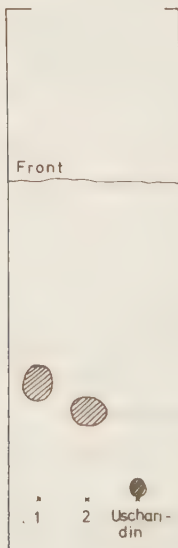


Abb. 13:
Papierchromatogramm
der Spaltung in
Äthanol(1) und
Methanol(2).
Papier ist formamid-
imprägniert.
Laufmittel: Chloroform/
Benzol (1:1)
Laufzeit: 30 min
Entwickelt mit
Kedde-Reagens

Aus der aufgearbeiteten organischen Phase wurden zunächst 385 mg fast farbloses Rohprodukt isoliert. Da nach dem Dünnschichtchromatogramm der Substanz noch Spuren von Ausgangsmaterial vorhanden waren, wurde an einer Kieselgel-Säule (Aktiv. IV) gereinigt. Dem Start-Elutionsmittel Chloroform wurden zunehmende Mengen Essigester zugemischt. Bei der ungefähren Zusammensetzung $\text{CHCl}_3/\text{Essigester}$ (1:3) waren die Fraktionen 194 und 195 kedde-aktiv. Aus diesen Fraktionen wurden 230 mg farbloses, glasiges Material vom Schmp. 148 bis 150 °C isoliert. Die Substanz war chromatographisch rein. Für die optische Drehung wurde in Äthanol ein Wert $\alpha_D^{18} = -34,0^\circ \pm 3,0^\circ$ gefunden. Die in der Verbrennungsanalyse gefundenen Werte ($C_{\text{gef}} = 69,8\%$ und $H_{\text{gef}} = 8,9\%$) sind in guter Übereinstimmung mit der Verbindung $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{O}_6$ ($C_{\text{ber}} = 70,4\%$, $H_{\text{ber}} = 8,7\%$), dem Calotropagenindiäthyläther. Das Massenspektrum bestätigt das Molekulargewicht durch einen um die Masse 1 erniedrigten Massenpeak. Die Fragmentierungen der Verbindungen sind aus Abb. 14 zu entnehmen.

Das Antreten eines (M-1)-Peaks ist hier nicht überraschend, da dieses Fragment bei Äthern und Alkoholen öfters auftritt⁷⁸⁾. Daß neben dem Butenolid-System nur noch eine Aldehydgruppierung am Genin sitzt, ist aus dem UV-Absorptionsspektrum (Abb. 15) zu erkennen, da neben dem Butenolidmaximum bei 240 m μ ($\log \epsilon = 4,35$) wiederum ein Nebenmaximum bei 314 m μ ($\log \epsilon = 1,06$) auftritt.

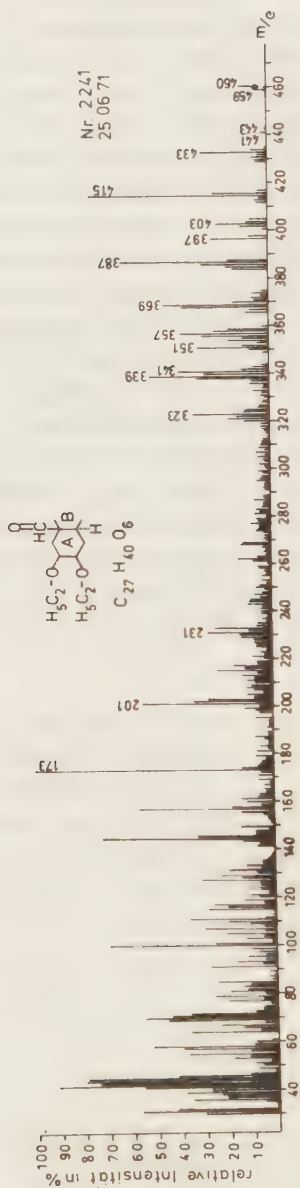


Abb. 14: Massenspektrum von Calotropagenindiäthyläther; Schmp. 148 - 150 °C,
Direkteinlaß 180 °C

Versuchsweise Zuordnung: 460 = M⁺ (nicht sichtbar); 459 = M-1; 443 = M - OH;
 441 = 459 - H₂O; 433 = 459 - C₂H₂; 415 = 433 - H₂O; 403 = 433 - CH₂O; 397 = 415 - H₂O;
 387 = 415 - CO; 369 = 387 - H₂O; 357 = 387 - CH₂O; 351 = 369 - H₂O; 339 = 357 - H₂O;
 323 = 351 - C₂H₄ bzw. CO.

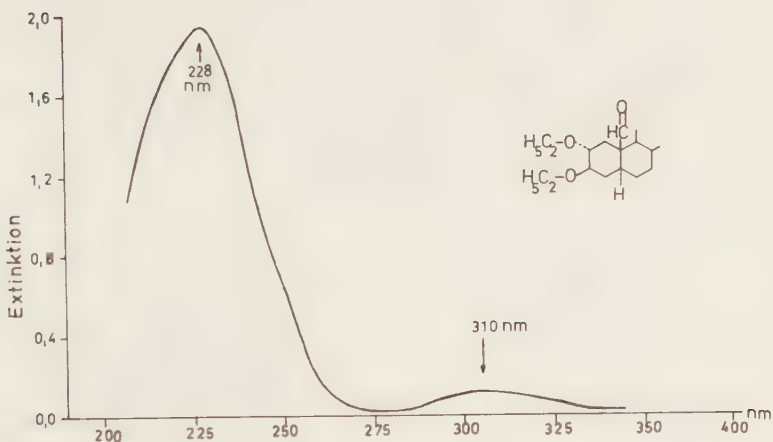


Abb. 15: UV-Absorptionsspektrum von Calotropagenin-diäthyläther in Äthanol (Maxima berechnet auf $C_{27}H_{40}O_6$)

Es zeigt sich also auch in Äthanol die Lösungsmittelabhängigkeit der Spaltung, wobei aus der organischen Phase wiederum nicht das Calotropagenin, sondern die mit 2 Molekülen aus dem Lösungsmittel verätherte Verbindung isoliert wird. Interessant war nun der Verlauf der $MgCl_2$ -Spaltung in absolutem i-Propanol, wo neben einem Diisopropyläther auch ein herzaktives Produkt isoliert wurde, bei dem nach dem Ergebnis der Massenspektroskopie nur eine OH-Gruppe des Genins veräthert wurde. Bei der in absolutem i-Propanol verlaufenden Spaltung von Uscharidin mit $MgCl_2$ zeigte sich erst nach 36stündigem Rühren und anschließendem kurzen Erhitzen des Reaktionsgemisches ein neuer Fleck im Dünnschichtchromato-

gramm. Nach der üblichen Aufarbeitung wurde das kedde-aktive Produkt aus der organischen Phase mit verschiedenen Laufmitteln papierchromatographisch auf Reinheit untersucht. Dabei zeigte sich, daß der im Dünnschichtchromatogramm ursprünglich einheitliche Fleck tatsächlich aus zwei herzaktiven Verbindungen besteht. Ein Stoff liegt auf fomamid-imprägniertem Papier unterhalb von Ucharidin, einer oberhalb (Abb. 16).

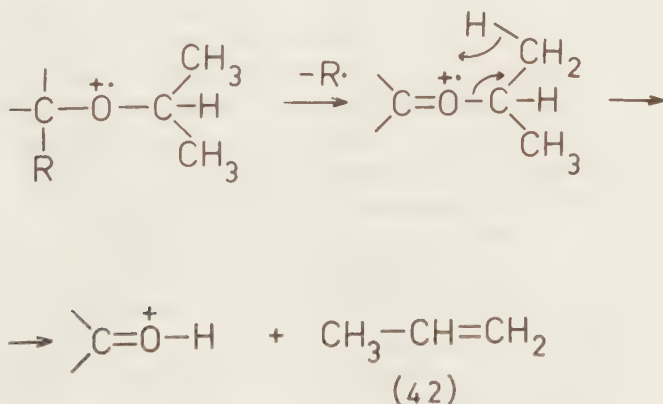


Abb. 16:
Papierchromatogramm
der $MgCl_2$ -Spaltung
in i-Propanol (abs.)

Papier ist fomamid-
imprägniert;
Laufmittel: Benzol/
Chloroform (1:1);
Laufzeit: 30 min;
entwickelt mit
Kedde-Reagens.

Der Versuch einer Auftrennung an einer Kieselgel-Säule mißlang, da keine chromatographisch einheitlichen Stoffe isoliert wurden. Die kedde-aktiven Fraktionen erhielten immer Anteile des anderen Spaltproduktes. Danach wurde eine präparative dünnschichtchromatographische Trennung durchgeführt. In Vorversuchen wurde das System Essigester/Aceton (9:1) als bestes Laufmittel ermittelt.

An einer selbstbereiteten Kieselgel-Platte wurden 34 mg Rohprodukt zweimal entwickelt und die beiden herzigifthaligen Zonen mit Hilfe einer UV-Lampe ermittelt. Aus der unteren Zone wurden so 3 mg und aus der oberen Zone 13 mg kedde-aktives Material in chromatographisch reiner Form isoliert. Es war schon aus der Intensität der Flecken im Papierchromatogramm zu erkennen, daß die Komponente mit dem größeren R_f -Werten das Hauptprodukt der Reaktion darstellt. Die zweite Verbindung ist nur mit 23 % im isolierten Material vorhanden. Die Hauptkomponente schmilzt bei 236 bis 237 °C. Der gefundene Wert für die spezifische Drehung ist $\alpha_D^{18} = -30,0^\circ \pm 3,0^\circ$ (in Alkohol). Diese Verbindung zeigte im Massenspektrum die dem Calotropagenindiisopropyläther zuzuordnende Fragmentierungen. Ein Molekülpeak war nicht zu finden, was in der Herzgiftchemie nicht überrascht. Das in den Fragmentierungen auftauchende Bruchstück $\text{CH}_3 - \text{CH} = \text{CH}_2$ ist in den Massenspektren von Isopropyläthern charakteristisch. Das Zerfallschema wird mit einer H-Wanderung zum Oxoniumion gedeutet⁽⁷⁷⁾:



Unter Berücksichtigung dieses Zerfallsschemas ist die in Abb. 17 aufgezeigte Fragmentierung zu verstehen.

Das Ergebnis wird durch die Werte der Verbrennungsanalyse bestätigt ($C_{\text{gef}} = 71,1 \%$; $C_{\text{ber}} = 71,3 \%$; $H_{\text{gef}} = 9,01 \%$; $H_{\text{ber}} = 9,02 \%$). Das UV-Absorptionsspektrum weist große Ähnlichkeit mit den bei Calotropagenindimethyläther, bzw. Diäthyläther gefundenen Werten auf ($\lambda_{\text{max } 1} = 235 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,4$; $\lambda_{\text{max } 2} = 295 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 1,32$). Die spektroskopischen Untersuchungen konnten wegen Substanzmangel bei der zweiten aus der präparativen Schicht isolierten Verbindung nicht gemacht werden. Die massenspektroskopischen Befunde ergeben hier bei einem angenommenen Massenpeak $M^+ = 446$ eine auf Calotropageninmonoisopropyläther passende Fragmentierung (Abb. 18). Auch hier taucht das Bruchstück Propen auf, das aus der i-Propylgruppe stammt.

Eine Entscheidung, ob die i-Propylgruppe am C_{-2} oder C_{-3} des Genins hängt, kann nicht getroffen werden. Aus Analogiegründen und dem postulierten Mechanismus der Ätherspaltung ist die i-Propylgruppe am C_{-3} des Genins wahrscheinlich. Der Beweis dafür konnte im Rahmen der Arbeit wegen Materialmangels nicht erbracht werden. Eine Überprüfung am Modell zeigt, daß der trans-ständige Diisopropyläther sterisch noch möglich ist, aber schon eine gewisse Wechselwirkung vorhanden ist. Dadurch dürfte das Auftreten eines sterisch weniger benachteiligten Monoäthers als Nebenprodukt der Uscharidin-Spaltung zu erklären sein. Diese sterische Hinderung der benachbarten Gruppen ist bei den Dimethyl- bzw. Diäthyläthern nicht vorhanden. Ein Spaltungsversuch mit tert.-Butanol bei 28°C brachte auch nach 48 Stunden kein Ergebnis. Bei zwei Ansätzen wurde jeweils das Ausgangsmaterial isoliert. Aus der chromatographischen Untersuchung ergab sich kein Hinweis auf die Bildung eines kedde-aktiven Spaltproduktes. Diese Beobachtung stützt neben der Tendenz der sterischen Beeinflussung der Spaltung durch die voluminöse tert.-Butylgruppierung auch den postulierten Mechanismus der Spaltung bei heterolyti-

ischem Verlauf, da eine Hydrid-Übertragung bei dem Meerwein-Ponndorf-analogen Schritt während der Glykosidabspaltung hier nicht mehr möglich ist.

5. Untersuchungen zur Struktur des Herzgiftzuckers

a) Dünnschichtchromatographischer Nachweis

Nachdem die bei der Spaltung auftretenden kedde-aktiven Spaltprodukte identifiziert wurden, war es notwendig, den aus Uscharidin abgespaltenen "Zucker" zu untersuchen. Im Gegensatz zu den bisher durchgeführten Brenzbedingungen bei der Calotropin-Spaltung waren die Bedingungen der $MgCl_2$ -Spaltung von Uscharidin und die anschließende Aufarbeitung sehr mild. Es ist hier naheliegend, daß das Spaltstück in der wässrigen Phase der Aufarbeitung im Grundgerüst unverändert vorliegt. Nach jeder Spaltung wurde durch eine sofortige Gefrier-trocknung der wässrigen Phase eine Konservierung des nicht kedde-aktiven Anteils erreicht. Aus einem Ansatz (1 mmol Uscharidin, 4 mmol $MgCl_2 \cdot Et_2O$) wurden so zwischen 590 und 609 mg farbloses, amorphes Material aus der gefriergetrockneten wässrigen Phase isoliert. In der Hauptsache handelt es sich hier um $MgCl_2$ bzw. dessen Hydrolyseprodukte. Eine Abtrennung der anorganischen Salze vom Calotropis-Glykosid wäre nur mit Hilfe von Ionenaustauschern möglich gewesen. Einen großen Substanzverlust und eventuelle Veränderungen des "Glykosids" hätte man dabei in Kauf nehmen müssen. Es wurde daher das insgesamt aus der Gefrier-trocknung erhaltene Material eingesetzt. Die anorganischen Salze erwiesen sich in keinem Fall als besonders störend.



Abb. 18: Massenspektrum des Calotropagenin-Monoisopropyläthers; Schm. 208 - 209°
Ofen 210°

Versuchsweise Zuordnung: M^+ = 446 (nicht sichtbar); 429 = M - OH; 428 = M - H_2O ;
 414 = 429 - CH_3 ; 402 = M - CH_3 - CH = CH_2 ; 440 = 428 - H_2O ; 396 = 414 - H_2O ;
 381 = 396 - CH_3 ; 372 = 414 - CH_3 - CH = CH_2 ; 368 = 396 - CO; 366 = 396 - CH_2O ;
 342 = ? ; 323 = 342 - H_2O oder 366 - CH_3 - CH = CH_2 .

Einen ersten Hinweis auf das Glykosid erbrachte das Massenspektrum des gefriergetrockneten Materials (Abb. 19). Das aus Uscharidin abgespaltene Bruchstück besitzt zwar wie die Herzgiftmethylreduktinsäure bzw. Methylreduktinsäure die Masse 128, verhält sich aber in der Fragmentierung etwas anders als die HMRS (Abb. 5) und die synthetische Methylreduktinsäure (Abb. 6).

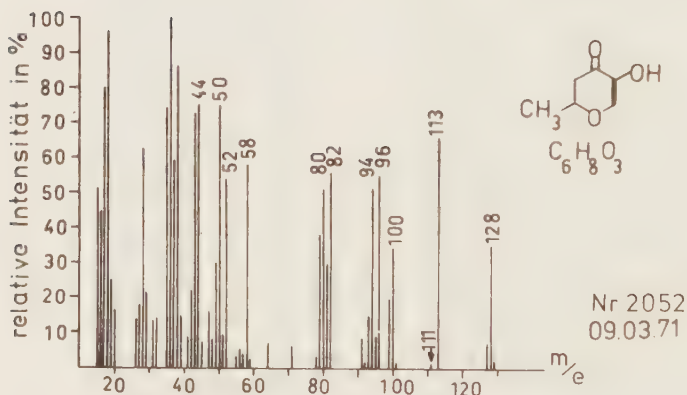


Abb. 19: Massenspektrum des aus der $MgCl_2$ -Spaltung erhaltenen Herzgiftzuckers

Versuchsweise Zuordnung: $M^+ = 128$; $111 = M-OH$;
 $100 = M - CO$; $99 = M - CH_2OH$; $96 = 111 - CH_3$;
 $82 = 100 - H_2O$; $58 = Mg(OH)_2$.

Dieses Bruchstück wurde nach jeder erfolgreichen MgCl_2 -Spaltung erhalten, unabhängig vom Lösungsmittel. Die beim kedde-aktiven Spaltprodukt gefundene Lösungsmittelabhängigkeit tritt hier also nicht auf. Es handelt sich in jedem Fall um das gleiche glykosidische Spaltstück. Aufgrund der von Reichstein postulierten Struktur für die Calotropis-Glykoside ist hier für das aus Uscharidin gewonnene Glykosid eine Desoxyenose mit Pyranosestruktur (Struktur II) zu erwarten. Um nun das hier gefundene glykosidische Spaltprodukt dünnenschichtchromatographisch nachzuweisen, wurden die für desoxyzuckerhaltigen Verbindungen charakteristischen Anfärbungen mit Perchlorsäure/Aceton⁷⁹⁾ und Vanillin/Perchlorsäure⁸⁰⁾ versucht. Die gefundenen Farbreaktionen deuten auf eine Desoxyzuckergruppierung hin. Nach Erprobung an verschiedenen Kieselgel-Fertigplatten wurden eindeutige Ergebnisse mit einem von W. Fischer⁸¹⁾ für Desoxyzucker, mit und ohne Ketose im Molekül, angegebenen System gefunden. Auf einer Polygram-Sil-G Fertigplatte (Marcherey + Nagel) wurden neben 2-Desoxyglucose, 2-Desoxysorbit und 2-Desoxyribose als Vergleichssubstanzen, der aus der MgCl_2 Spaltung erhaltene Herzgiftzucker zusammen mit dem später synthetisierten 2-Methyl- Dihydropyranon-(4)-ol-(5) (II) zweimal mit Essigester/i-Propanol/Wasser (63:25:12) entwickelt. Danach wurden in drei Stufen die Flecke sichtbar gemacht: mit wässriger Perjodatlösung wird zur Oxydation der Desoxyverbindungen besprüht und stehen gelassen. Dann wird mit Natriumarsenitlösung (in HCl) besprüht, um die überschüssige Perjodsäure zu zerstören. Danach werden mit 3,5-Diaminobenzoesäurehydrochlorid-Lösung die Flecken sichtbar gemacht (Abb. 20).

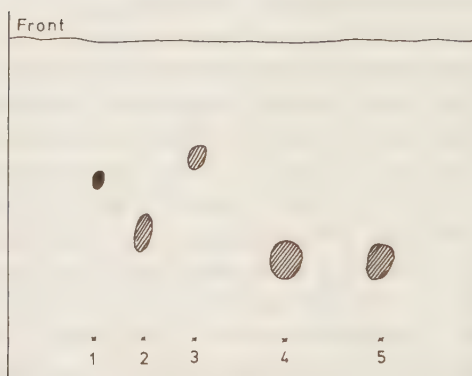


Abb. 20: Dünnschichtchromatogramm von Desoxyzuckern mit dem aus der Spaltung erhaltenen und dem synthetisierten Herzgiftzucker

- | | |
|---------------------|-----------------------------|
| 1 = 2-Desoxyglucose | 4 = Herzgiftzucker aus der |
| 2 = 2-Desoxysorbit | MgCl ₂ -Spaltung |
| 3 = 2-Desoxyribose | 5 = Herzgiftzucker (synth.) |

Die auftretenden olivgrünen Flecken bei allen fünf Verbindungen sind nicht nur ein Hinweis auf die Desoxygruppierung der Glykoside, sondern auch einer der Beweise dafür, daß der Herzgiftzucker aus der MgCl₂-Spaltung und die später synthetisierte Verbindung II identisch sind.

b) Untersuchung der DNP's

Einen weiteren Hinweis auf funktionelle Gruppen erbrachte eine positive Reaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin. Allerdings muß man mit 2n salzsaurer DNP-Lösung arbeiten. Die phosphorsaure DNP-Lösung ergab auch nach 24 h keine Reaktion. Die gelbe Farbe des DNP deutet auf eine Carbonylfunktion hin, die nicht mit einer anderen Gruppe konjugiert ist. In der papierchromatographischen Untersuchung ergab sich, daß die Laufstrecke des DNP auf formamid-imprägniertem Papier und dem System Dimethylformamid/ NH_3 conc. (6:4)³⁵⁾ als Laufmittel ähnliche Laufstrecken wie Glyoxal-DNP aufweist. Das erhaltene DNP ergibt mit Lauge eine tiefe violette Farbreaktion, wie sie für Osazone typisch ist.

Auch die UV-Spektren bestätigen diese Carbonylfunktion. Sie zeigten für den aus der Spaltung erhaltenen Herzgiftzucker und der später erhaltenen synthetischen Verbindung II eine gute Übereinstimmung. Das jeweils gefundene $\lambda_{\text{max}} = 208$ bis $209 \text{ m}\mu$ (in Äthanol) kann dem $\pi - \pi^*$ Übergang eines α, β -ungesättigten Sechsring-Ketons zugeordnet werden. Der für derartige Systeme angegebene Richtwert liegt bei etwa $215 \text{ m}\mu$ ⁷⁷⁾. Dieses Absorptionsmaximum wurde auch beim γ -Pyron gefunden, das ebenfalls die Gruppierung $\text{>C} = \overset{\cdot}{\text{C}} - \overset{\cdot}{\text{C}} = \text{O}$ besitzt (Abb. 21). Das beim γ -Pyron zusätzlich gefundene Absorptionsmaximum $\lambda_{\text{max}} = 248 \text{ m}\mu$, das durch das quasiaromatische System des γ -Pyrons verursacht wird, taucht beim Herzgiftzucker natürlich nicht auf. Allerdings ist die Angabe von ξ -Werten bei dem aus der Spaltung erhaltenen Herzgiftzucker nicht möglich, da der Zucker zusammen mit den Hydrolyseprodukten des MgCl_2 vermessen wurde und so eine Konzentrationsangabe nicht möglich ist. Die Befunde bestätigen aber das α, β -ungesättigte Ringketon.

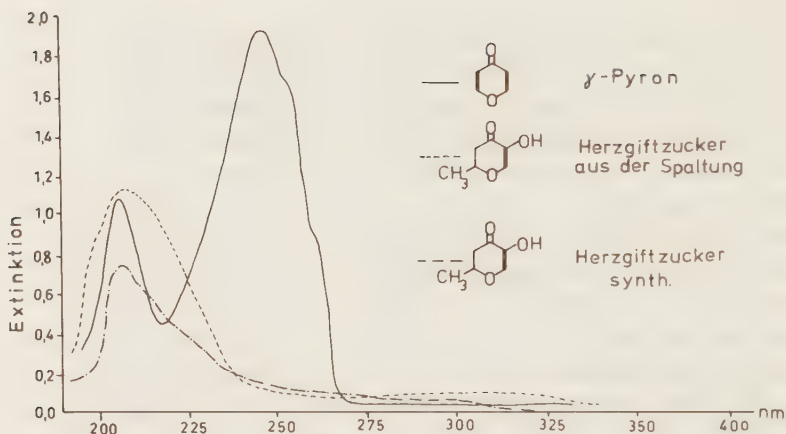


Abb. 21: UV-Absorptionsspektrum des synthetischen und des aus der Spaltung erhaltenen Herzgiftzuckers.

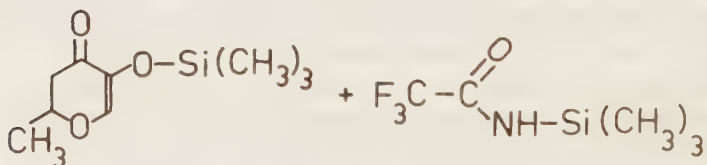
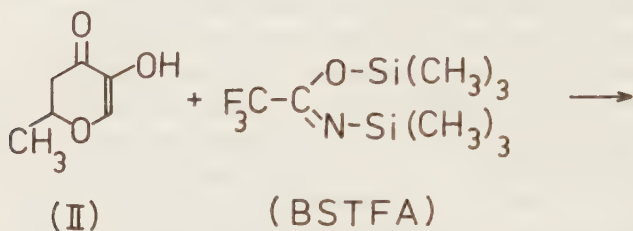
Als Vergleichssubstanz ist das γ -Pyron angegeben.

Der Versuch einer Ketalisierung der Carbonylfunktion des Herzgiftzuckers mit Orthoameisensäureester bei Gegenwart von Äthanol und einer Spur HCl⁸²⁾ und die anschließende Untersuchung der Reaktionsprodukte mit Hilfe der Gaschromatographie schlug fehl, da die gebildeten Substanzen bei relativ niedriger Ofentemperatur in der Säule hängen bleiben. Bei Temperaturerhöhung tauchten nicht zu identifizierende, für Zersetzungsprodukte typische Peaks mit sehr langem "tailing" auf. Andere Möglichkeiten zur Identifizierung des Ketals können hier nicht angewandt werden, da wegen der geringen Substanzmengen nur chromatographische Methoden in Frage kommen.

c) Silylierung

Eine der heute häufig angewandten Methoden, nicht flüchtige Verbindungen mit aktivem Wasserstoff in flüchtige, stabile Verbindungen überzuführen, ist die Möglichkeit der Silylierung. Diese Derivate können einfach und mit gängigen Methoden hergestellt werden. Der Vorteil des Verfahrens liegt darin, daß die Umsetzung in wenigen Minuten bei Raumtemperatur quantitativ verläuft. Auch kleinste Mengen können so gaschromatographisch identifiziert werden. In der postulierten Struktur des Herzgiftzuckers liegt eine enolisierte OH-Gruppe vor, die nach den bisherigen Erfahrungen leicht silylierbar sein müßte. Nach dem von Sweeley et al.⁸³⁾ ausgearbeiteten Verfahren der Silylierung von Zuckern mit Hexamethyldisilazan und Trimethylchlorosilan in Pyridin und anschließende Gaschromatographie wurden aber keine eindeutigen Ergebnisse erzielt. Obwohl der Rückstand der Gefriertrocknung zur Anreicherung des Zuckers mit Pyridin extrahiert wurde, ist die anschließend erhaltene Zuckermenge im Vergleich zur Lösungsmittelmenge so gering, daß im Gaschromatogramm aus dem Untergrund der Basislinie kein definierter Peak zuzuordnen war. Um den bei diesem Verfahren benötigten großen Pyridinüberschuß zu umgehen, wurde nach geeigneteren Silylierungsbedingungen gesucht. Nachdem die in letzter Zeit für die Silylierung von Aminen und Alkoholen entwickelten Silylamine $R-NH-Si(CH_3)_3$ und Silylamide des Typs $R-CO-N[Si(CH_3)_3]_2$ bessere Ergebnisse als die klassische Silylierung mit Trimethylchlorosilan brachte, war der Hinweis von R. W. Zumwalt⁸⁴⁾ interessant, daß das von ihm eingesetzte N,O-Bis(-trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA) die bisher benötigten großen Pyridinmengen überflüssig macht,

da das von ihm eingesetzte Reagens zugleich Silylierungs- und Lösungsmittel ist. Dadurch kann man die für die Gaschromatographie vorbereitete Probe in konzentrierterer Form in die Säule einspritzen. Das Silylierungsprodukt muß dann als eindeutiger Peak erscheinen. Im Falle des Herzgiftzuckers müßte die Silylierung folgendermaßen verlaufen:



Obwohl der silylierte Herzgiftzucker weniger polar ist als der nicht silylierte, war die Trennung an einer unpolaren Säule (20 % SE-30) nicht selektiv. Offenbar hatte die Säule saure Bedingungen, die eine Zersetzung der Trimethylsilylkomponente bedingten. Erst eine mit Trimethylchlorsilan behandelte Carbowachs-Säule brachte ein eindeutiges Ergebnis, wenn das Gaschromatogramm mit einem Temperaturprogramm zwischen 130 °C und 180 °C gefahren wird. Das Ergebnis ist in Abb. 22 abgebildet. Ein mit diesen Bedingungen gefahrenes Chromatogramm der später synthetisierten Verbindung II brachte ein reproduzierbares Ergebnis. Die Nettoretentionszeit war identisch mit dem oben gefundenen Wert. Das Ergebnis ist ein weiterer Beweis dafür, daß die für den Herzgiftzucker postulierte Struktur II tatsächlich vorliegt. Die silylierte

synth. Methylreduktinsäure hat bei den gleichen apparativen Bedingungen eine wesentlich größere Nettoretentionszeit.

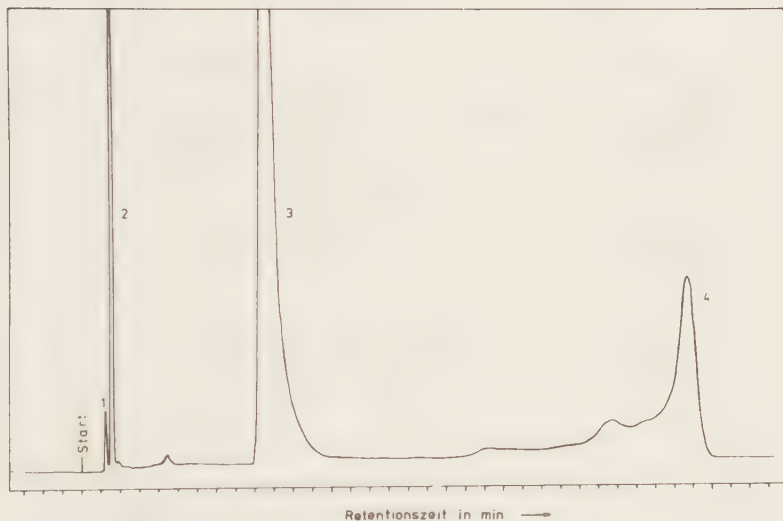


Abb. 22: Gaschromatogramm des aus der MgCl_2 -Spaltung erhaltenen silylierten Herzgiftzuckers

1 = Luft

2 = Pyridin

3 = BSTFA

4 = silylierter Herzgiftzucker

Säule: 2mal 2m 20 % Carbowachs auf Kieselgur 0,2 mm

Temperaturprogramm: 130 °C → 180 °C, 6 °C/min

Probe: 1,5 µl

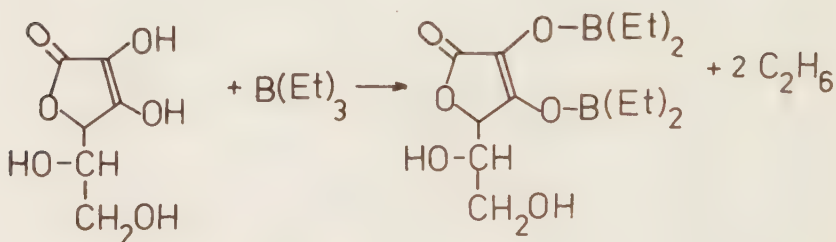
Trärgas: He 40 ml/min

Detektor: Wärmeleitfähigkeitsdetektor

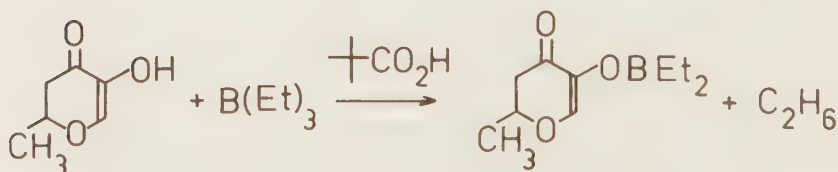
Instrument: Hewlett-Packard 5750 Research Chromatograph

d) Umsetzung mit Bortriäthyl

Köster et al.⁸⁵⁾ hat die Ascorbinsäure mit Bortriäthyl unter Säurekatalyse (Pivalinsäure) umgesetzt und so ein flüchtiges Derivat von Vitamin C erhalten:



Diese Reaktion sollte sich auch auf den Herzgiftzucker übertragen lassen. Das erwartete Reaktionsschema wäre:



Die Umsetzung verläuft tatsächlich unter anfänglicher Gasentwicklung und Bildung einer homogenen Lösung. Nach dem Abziehen von überschüssigem Bortriäthyl bleibt ein gelbes Öl, das nach dem Gaschromatogramm (20 % Polyäthylenglycol auf Kieselgur) ein einheitliches Produkt mit relativ hohem Siedepunkt ist. Nach dem Massenspektrum liegt das Molekulargewicht der Substanz über 365. Aufgrund der Isotopenverteilung in borhaltigen Verbindungen ist eine Aussage nur soweit möglich, daß im Fragment 365

wahrscheinlich zwei Boratome vorhanden sind. Die Frage, um welches Dimerisationsprodukt es sich hier handelt, konnte aber aus der Fragmentierung der Substanz nicht geklärt werden.

e) Permethylierung

Eine weitere Möglichkeit, ein destillierbares oder sublimierbares Derivat des Herzgiftzuckers zu synthetisieren, wäre die Permethylierung. Von der chemischen Seite her ist die Darstellung von Methyläthern der Kohlenhydrate schon lange bekannt. Die Methylierung mit Alkylsulfonsäuremethylestern (z. B. Toluolsulfonsäuremethylester)⁸⁶⁾ oder mit Dimethylsulfat⁸⁷⁾ erfordert aber ein alkalisches Medium und gegen Ende der Reaktion ein Erhitzen zum Rückfluß, um das überschüssige Methylierungsmittel zu zerstören. Dieses Reaktionsmedium und die anschließende Aufarbeitung ist aber beim Herzgiftzucker wegen der Möglichkeit von Artefaktbildung nicht angebracht. Erst die Methylierung mit Diazomethan oder Methyljodid verlaufen unter so schonenden Bedingungen, daß sie für die Methylierung des Herzgiftzuckers in Frage kommen. Da aber die Reaktion mit Diazomethan nach der dünnschichtchromatographischen Kontrolle kein einheitliches Reaktionsprodukt ergab - es wurde im wesentlichen wieder das Ausgangsmaterial isoliert -, wurde ein Permethylierungsversuch mit Methyljodid nach der von Kuhn et al.⁸⁸⁾ angegebenen Methode versucht. Die Methylierung mit CH_3J und BaO in Dimethylformamid hat den Vorteil, alle Hydroxyle von Zuckern und Zuckerderivaten meist schon in einer Operation zu erfassen. Es macht die öfters erforderlichen mehrmaligen Nachmethylierungen entbehrlich. Es wurden so nach dieser Methode tatsächlich sowohl bei dem aus der MgCl_2 -Spaltung erhaltenen Herz-

giftzucker als auch bei der synthetisierten Verbindung II dünnschichtchromatographisch einheitliche Produkte isoliert (Abb. 23). Die beiden Verbindungen zeigten nach der Entwicklung langsam verblassende gelbe Flecken mit gleichem R_f -Wert ($R_f \approx 1,14$).



Abb. 23: Dünnschichtchromatogramm der permethylierten Verbindungen auf Kieselgel G

1 = permethylierter Herzgiftzucker aus der Spaltung

2 = permethylierter synthetischer Herzgiftzucker

3 = permethylierte Lactose als Vergleichssubstanz

Laufmittel: Äther/Toluol (67:33)

Dauer: 15 min

Entwicklung: 30 min mit J_2 -Dampf behandeln.

Falls es sich um den Methyläther des Herzgiftzuckers handelt, sollte eine gaschromatographische Untersuchung möglich sein. Es waren nämlich permethylierte Glykoside,

die erstmals eine gas-flüssig chromatographische Untersuchung der nichtflüchtigen Kohlenhydrate ermöglichen⁸⁹⁾. Die bisher veröffentlichten Untersuchungen wurden fast ausschließlich an mittelpolaren Esterphasen gemacht⁹⁰⁾. Uns stand eine mit Di-n-Decylphthalat belegte Säule zur Verfügung, die hierfür geeignet sein sollte. Tatsächlich wurde an dieser Säule ebenfalls die Einheitlichkeit des jeweils angefallenen leicht gelben, hochviskosen Öls bestätigt. Neben einer Spur Dimethylformamid aus der Reaktionslösung wurde nur noch eine relativ hochsiedende Komponente gefunden (Bedingung: 2mal 2 m 20 % Di-n-decylphthalat auf Kieselgur, WLD, He 40 ml/min, Ofen 180 °C). Daß es sich bei den gefundenen Produkten tatsächlich um den Monomethyläther des Herzgiftzuckers handelt, wurde im Massenspektrum bestätigt (Abb. 24).

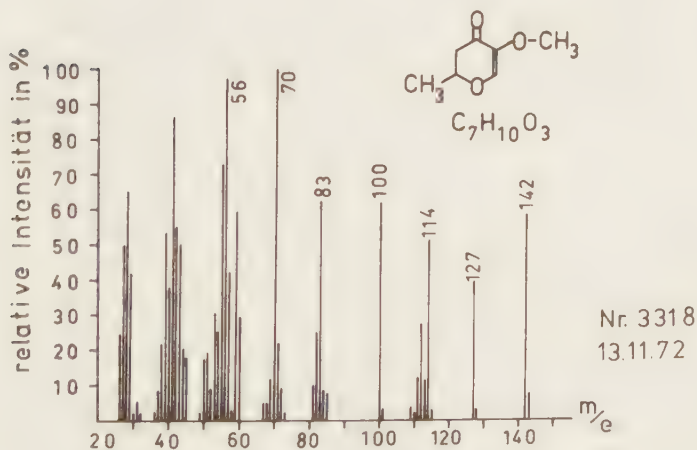
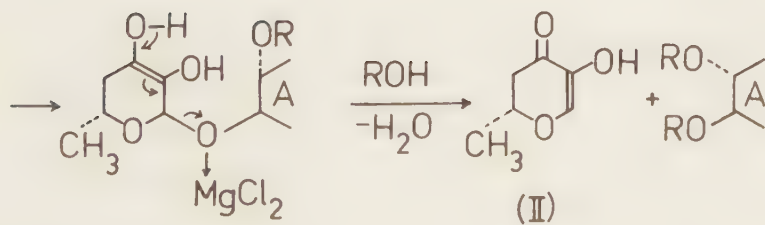
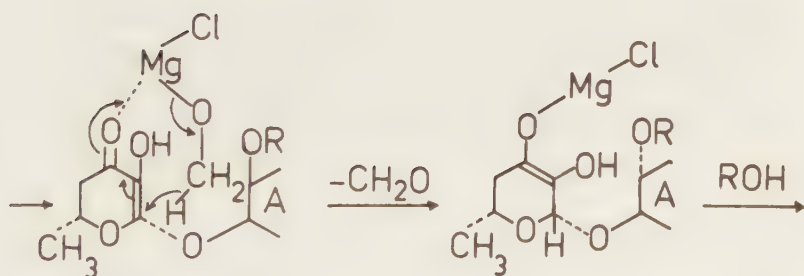
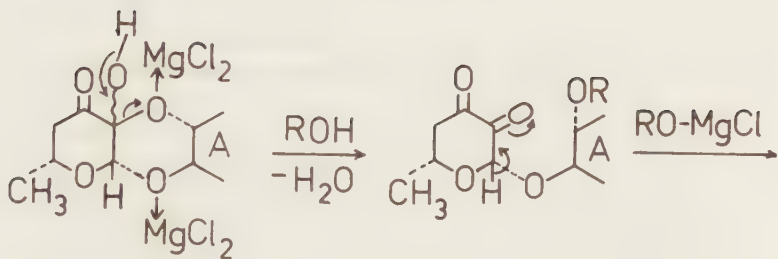


Abb. 24: Massenspektrum des methylierten Herzgiftzuckers
 Direkteinlaß-System: 40 °C
 Versuchsweise Zuordnung: $M^+ = 142$; $127 = 142 - CH_3$;
 $114 = 142 - CH_2CO$; $83 = 114 - OCH_3$.

Ein vergleichbares Massenspektrum wurde später aus der nach dem Kuhnschen Verfahren methylierten synthetisierten Verbindung II erhalten. Dies ist wiederum ein Beweis für die übereinstimmenden Strukturen der Verbindung II mit dem aus der MgCl_2 -Spaltung erhaltenen Herzgiftzucker.

6) Mechanismus der Ucharidin-Spaltung

Obwohl eine umfassende Betrachtung dieser Spaltungsmechanismen noch aussteht, können über den Reaktionsverlauf der Ucharidin-Spaltung bereits Vermutungen angestellt werden. Der einleitende Schritt dürfte die Polarisierung der Äther- bzw. Halbacetalbindung zwischen Glykosid und Genin sein. Der weitere Verlauf wäre am einfachsten durch Homolyse des Elektronenpaars zwischen "Glykosid" und dem Sauerstoff zum Genin unter sofortiger Bildung des Herzgiftglykosids zu erklären. Gegen diesen Mechanismus spricht aber die relativ niedere Reaktionstemperatur und die Anwesenheit der "harten Säure" MgCl_2 . Ein heterolytischer Verlauf ist wahrscheinlicher. Hier dürfte im ersten Schritt die Halbacetalbindung zwischen Genin und Glykosid geöffnet werden, wobei nach einer Enolisierung eine vinyloge Carbonylfunktion am Dihydropyranring entsteht. Durch intermediär gebildetes Magnesiumchloralkoholat erfolgt nun eine Hydridverschiebung an den glykosidischen Anteil unter gleichzeitiger Aldehydbildung der alkoholischen Komponente nach einem der Meerwein-Ponndorf-Reaktion ähnlichem Mechanismus. Die anschließende Ätherspaltung unter Bildung des γ -Pyronderivats wird durch die harte Säure MgCl_2 unter mildesten Reaktionsbedingungen ermöglicht. Insgesamt ergibt sich folgender Spaltungsmechanismus:

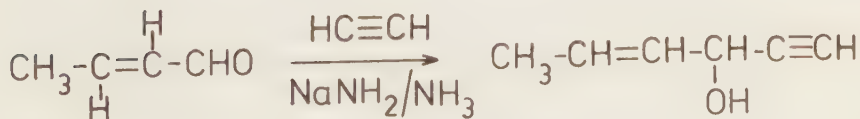
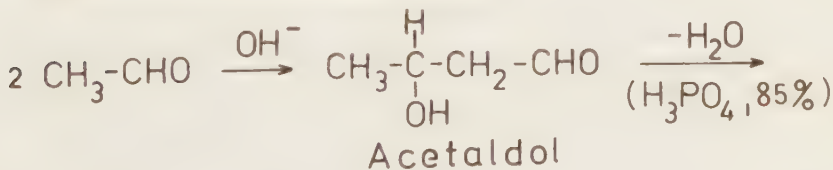


Diesen Mechanismus stützt die Beobachtung, daß die Spaltung von Calotropin unter gleichen Bedingungen wegen des Fehlens der vinylogen Carbonylfunktion keinen Erfolg zeigt. Dazu ist beim Übergang zu tert.-Butanol als Reaktionsmedium bei der Uscharidin-Spaltung wegen des Fehlens der Möglichkeit zur Hydridübertragung ebenfalls keine Reaktion mehr zu beobachten. Außerdem konnte bei der Spaltung in Methanol ein mit Formaldehyd-DNP papierchromatographisch gleichlaufendes DNP isoliert werden, wenn man während der Spaltung einen schwachen Stickstoffstrom durch die Reaktionslösung in eine phosphorsaure DNP-Lösung einleitet. Da auch die Verätherung des Calotropagenins unter den Bedingungen der $MgCl_2$ -Spaltung in Methanol ein mit calotropagenindimethyläther gleichlaufendes Produkt ergibt, spricht der vorgeschlagene Mechanismus für den tatsächlichen Reaktionsverlauf.

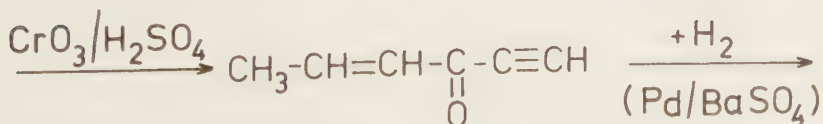
III. Synthetische Zuckerstruktur

Nachdem wir nun die Struktur des Herzgiftzuckers als gesichert betrachten, war es von Interesse, einen Syntheseweg für die Glykosidstruktur der Calotropis-Wirkstoffe auszuarbeiten. In der Literatur war kein Hinweis auf die Struktur des 2-Methyldihydropyranon-(4)-ol-(5) zu finden. Das Grundgerüst dieser Verbindung, das 2-Methyltetrahydropyranon-(4), ist aber bereits beschrieben. Nach einer Patentvorschrift der Farbenfabriken Bayer⁹¹⁾ wird das 2-Methyltetrahydropyranon-(4) aus 1-Hydroxyhexen-(5)-in-(2) durch Erwärmen in schwefelsaurer Lösung mit Quecksilber(II)sulfat als Katalysator hergestellt. Diese Vorschrift wurde wegen der ungenauen Reaktionsbedingungen und der Unzugänglichkeit des dazu benötigten Alkeninols nicht herangezogen.

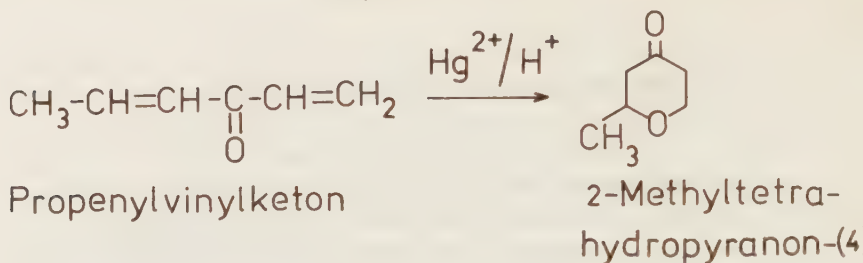
Ein zweiter sechstufiger Reaktionsweg würde sich aus folgenden Schritten zusammensetzen:



Crotonaldehyd

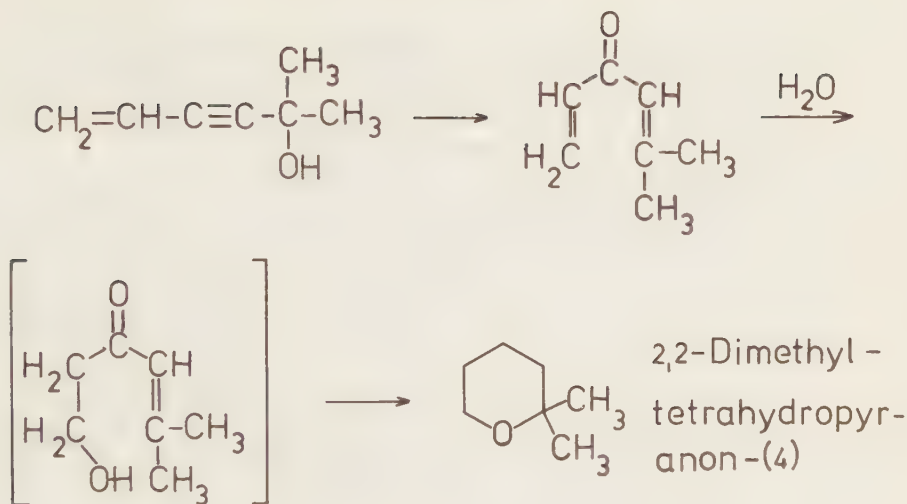


Propenyläthynylketon



Dieser Weg wurde an der Stufe der Hydrierung der Dreifachbindung im Propenyläthynylketon zum Propenylvinylketon abgebrochen, da der dafür angegebene Katalysator 5%Pd/BaSO₄ nicht zur gewünschten Verbindung führte. Eine Variation der Pd-Belegung des Trägermaterials brachte auch nicht den gewünschten Erfolg. Das Ergebnis waren immer gemischte Produkte. Nach der gaschromatographischen Untersuchung wurde im wesentlichen das Ausgangsmaterial neben drei verschiedenen Hydrierungsprodukten isoliert. Da die anschließende Cyclisierung mit Quecksilber(II)sulfat nur ein Analogieschritt wäre, der zudem nur sehr ungenau ausgearbeitet ist, wurde eine dritte Methode zur Darstellung des 2-Methyltetrahydropyranon-(4) versucht.

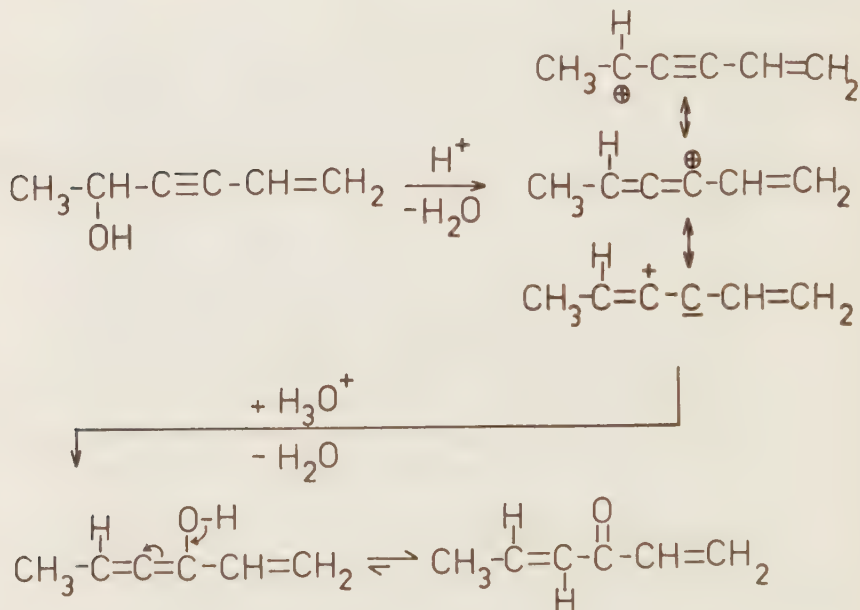
I. N. Nasarow^{92a-d)} hat beobachtet, daß bei der Einwirkung von Quecksilber(II)sulfat und 5%iger Schwefelsäure in der Hitze auf 2-Hydroxy-2-methylhexen-(5)-in-(3) als Hauptreaktion neben der Wasseranlagerung an die Doppelbindung eine Isomerisierung zu 2-Methylhexadien-(2,5)-on-(4) eintritt, gefolgt von Wasseranlagerung an die unsubstituierte Doppelbindung und Cyclisierung des so entstandenen Olefinalkohols zu 2-Methyltetrahydropyranon-(4) in 52%iger Ausbeute. Das Reaktionsschema soll folgendermaßen verlaufen:



Nach einem ähnlichen Mechanismus soll die Wasseranlagerung und Cyclisierung beim Hexadien-(1,5)-in-(3) unter Bildung von 2-Methyltetrahydropyranon-(4) in sehr geringen Ausbeuten verlaufen^{92a)}. Die von Nasarow bei Alkeninolen des Typs $(\text{R}, \text{R}')\text{C}(\text{OH})-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}=\text{CH}_2$ beobachtete Meyer-Schuster Umlagerung unter Säurekatalyse in Anwesenheit von Quecksilber(II)sulfat zu $(\text{R}, \text{R}')\text{C}=\text{CH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ geht nach J. Cologne⁹³⁾ in größeren Ausbeuten, wenn R und R' = H oder $-\text{CH}_3$ ist. Bei $\text{R}=\text{R}' \text{ C}_2\text{H}_5$ geht die Isomerisierung schlecht, und man beobachtet unkontrollierbare Folgereaktionen. Später hat Nasarow gezeigt, daß obige Ketone beim Erhitzen im sauren Medium unter Quecksilber(II)sulfat-Katalyse über das β -Ketol $(\text{R}, \text{R}')\text{C}=\text{CH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ in Tetrahydropyranone übergeführt werden können.

In Analogie zur Beobachtung von Nasarow sollte für das hier geforderte 2-Methyltetrahydropyranon-(4) als Grundgerüst der Calotropis-Glykoside als Alkeninol

2-Hydroxyhexen-(5)-in-(3) $\text{CH}_3\text{-CH(OH)-C}\equiv\text{C-CH-CH}_2$ eingesetzt werden. Unter dem Einfluß von sauren Katalysatoren sollte in einer Meyer-Schuster Umlagerung nach anionoider OH-Abspaltung über ein Carboniumion (analog zur Allylumlagerung) das Vinylallylketon entstehen:



Das erforderliche 2-Hydroxyhexen-(5)-in-(3) wurde bisher in einer aufwendigen Arbeit über die Reindarstellung von Vinylacetylen, anschließende Bildung des Acetylids und dann Umsetzung mit Acetaldehyd hergestellt⁹⁴⁾. Bei dem angegebenen Weg wurden bis zur Stufe des Acetylids mehrmals explosive Zwischenprodukte isoliert. Nach der Kondensation mit Acetaldehyd zum sekundären Alkohol müssen gummiartige Zwischenstufen aufge-

arbeitet werden. Das reine Alkinol wurde mit maximal 26 % Ausbeute isoliert, wobei aber im Reaktionsgemisch gelegentlich eine Polymerisation nicht auszuschließen war.

In Anlehnung an die in neuester Zeit von L. Brandsma⁹⁵⁾ ausgearbeiteten präparativen Methoden der Acetylenchemie wurde hier die Bildung von Vinylacetylen, die Umsetzung zum Vinylacetylid und die anschließende Kondensation mit Acetaldehyd in einer Eintopfreaktion durchgeführt. Mit diesem Verfahren, das sich ganz allgemein auf Kondensationen von Aldehyden mit Acetyliden ausdehnen läßt, wurde neben einer Zeitersparnis vor allem die Isolierung explosiver Zwischenstufen umgangen. Dazu wird in einer mit Eisen(III)nitrat katalysierten Reaktion aus einer "blauen Lösung" Natriumamid hergestellt. In dieses Reaktionsmedium wird 1,4-Dichlorbuten zugetropft. Das in einer heftigen Reaktion gebildete Vinylacetylen reagiert mit dem Überschuß an Natriumamid sofort weiter zum Acetylid. Nach dem Abziehen des Ammoniaks bleibt eine schwarze Kruste von Acetylid, die sich leicht in Äther suspendieren läßt. Im gleichen Kolben erfolgt dann die Kondensation mit frisch destilliertem Acetaldehyd. Hier werden nicht wie bei W. H. Carothers et al.⁹⁴⁾ gummiartige Substanzen, sondern ein grünbrauner Schlamm isoliert, aus dem nach der Aufarbeitung 2-Hydroxyhexen-(5)-in-(3) in 29 % Ausbeute erhalten wurde. Dieses Verfahren ist noch nicht optimiert. Durch weitere Variation der Reaktionstemperaturen und Reaktionszeiten ist es denkbar, daß die Bildung von Polymeren noch weiter zurückgedrängt wird.

Da von dieser Verbindung keine spektroskopischen Untersuchungen veröffentlicht sind, führen wir diese der Vollständigkeit halber an. Die Bildung von 2-Hydroxy-

hexen-(5)-in-(3) beweist das Massenspektrum in einem bei Alkoholen häufig auftretenden starken (M-1)-Peak und einer interpretierbaren Fragmentierung (Abb. 25). Überraschend war, daß im Infrarot-Spektrum die für die $C\equiv C$ -Valenz charakteristische Absorption bei der hohen Wellenzahl 2340 cm^{-1} auftaucht. Wir vermuten, daß dieser Effekt auf die zur $C\equiv C$ -Dreifachbindung α -ständige OH- bzw. Vinylgruppierung zurückzuführen ist. Die typischen Banden sind aus Abb. 26 zu entnehmen. Das UV-Absorptionsspektrum (Abb. 27) zeigt ein $\lambda_{\text{max}} = 233\text{ m}\mu$, das für einen derartigen Chromophor interpretiert werden kann. Neben der intensiven Hauptbande tauchen noch zwei Nebenspektren geringerer Intensität auf ($\lambda_{\text{max}1} = 223\text{ m}\mu$ und $\lambda_{\text{max}2} = 248\text{ m}\mu$). Die erste Bande führen wir auf die Elektroneanregung der nichtbindenden freien p-Elektronen des Sauerstoffs der Hydroxylgruppe zurück. Die Nebenspektren $\lambda_{\text{max}2} = 248\text{ m}\mu$ taucht auch bei der Verbindung $\text{CH}_3\text{-CH=C=CH-C}\equiv\text{C-CH}_2\text{OH}$ auf^{95a}, die man hier als Vergleichssubstanz anführen kann.

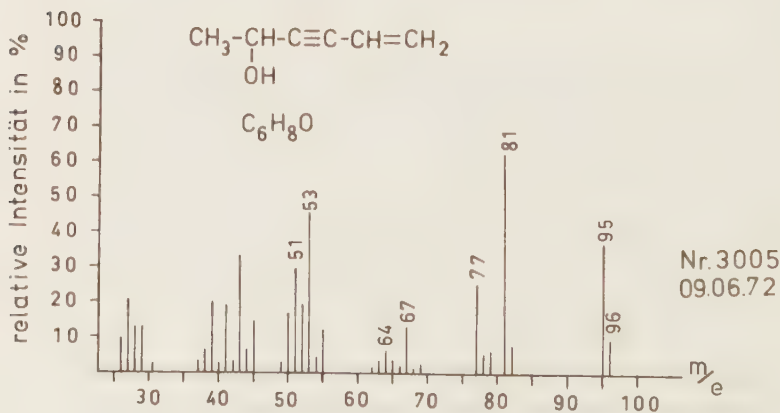


Abb. 25: Massenspektrum von 2-Hydroxyhexen-(5)-in-(3)
Versuchsweise Zuordnung: $M^+ = 96$; $95 = M - H\cdot$; $81 = M - \text{CH}_3$;
 $77 = M - \text{H}_2\text{O}$ oder $95 - \text{H}_2\text{O}$; $67 = 95 - \text{CO}$; $64 = 81 - \text{OH}$; $53 = 81 - \text{H}_2\text{O}$;
 $51 = M - \text{CH}_3 - \text{CH} = \text{OH}^+$

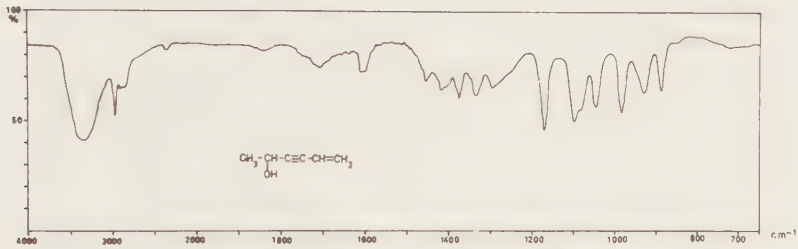


Abb. 26: IR-Absorptionsspektrum von 2-Hydroxyhexen-(5)-in(3)

3350 cm^{-1} freies OH, 2960 cm^{-1} CH_3 -Valenz,
2340 cm^{-1} $\text{C}\equiv\text{C}$ -Valenz, 1595 - 1612 cm^{-1} $\text{C}=\text{C}$ -Valenz.

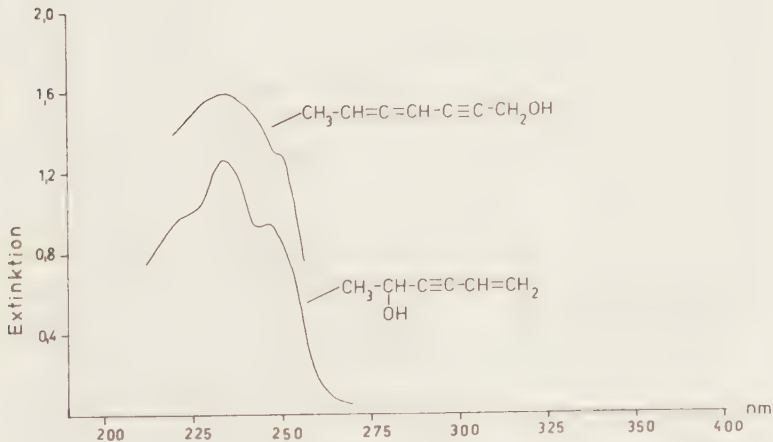


Abb. 27: UV-Absorptionsspektrum von 2-Hydroxyhexen-(5)-in(3)
mit $\text{CH}_3\text{-CH=C=CH-C}\equiv\text{C-CH}_2\text{-OH}$ als Vergleichs-
substanz (in Äthanol)

Das 2-Hydroxyhexen-(5)-in-(3) wird nun in schwefelsaurer Lösung mit Quecksilber(II)sulfat versetzt. Über eine stark zu Tränen reizende Zwischenverbindung, vermutlich das durch die Meyer-Schuster-Umlagerung entstandene Vinylallylketon, wurde bei erhöhter Temperatur eine Cyclisierung zum 2-Methyltetrahydropyranon-(4) erreicht. Diese Verbindung konnte mit Wasserdampf aus der Reaktionslösung getrieben werden und war nach der Aufarbeitung gaschromatographisch rein (Carbowachs 12M). Die farblose Flüssigkeit ($K_{p18} = 62 - 64^{\circ}\text{C}$) wurde in 68%iger Ausbeute erhalten. Daß es sich tatsächlich um die geforderte Verbindung handelt, beweist auch das Massenspektrum, wo neben dem eindeutigen Molekülpeak für die Verbindung interpretierbare Fragmentierungen auftreten (Abb. 28).

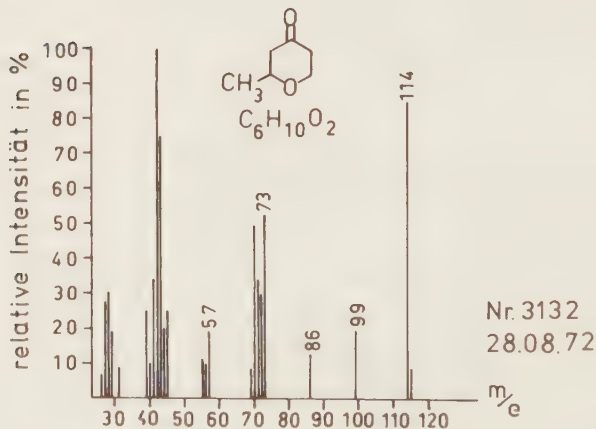


Abb. 28: Massenspektrum von 2-Methyltetrahydropyranon-(4)

Einlaß-System: HTE 150°C

Versuchswise Zuordnung: $\text{M}^+ = 114$; $99 = \text{M}-\text{CH}_3$; $86 = \text{M}-\text{CO}$; $73 = 99-\text{CH}=\text{CH} (?)$; $71 = 99-\text{CO}$; $70 = 71-\text{H}$.

Um nun vom 2-Methyltetrahydropyranon zu dem aus der $MgCl_2$ -Spaltung erhaltenen Calotropis- "Zucker", dem enolisierten 2-Methyltetrahydropyrandion-(4,5) zu gelangen, muß die Methylengruppe des Kohlenstoffs 5 im Pyranerüst oxydiert werden. Dafür bietet sich die von H. L. Riley⁹⁰⁾ gefundene Oxydation mit SeO_2 an, nach der Methylengruppierungen, die durch α -ständige ungesättigte Zentren, wie z. B. >C=C , >C=O oder C=N-Bindungen, aktiviert sind, in Ketofunktion umgewandelt werden. Diese Reaktion ist insoweit spezifisch, als i. a. keine weitere Oxydation im Molekül stattfindet. Nachdem die Oxydation des Cyclohexanons bei relativ milden Reaktionsbedingungen ($90^\circ C$, Dioxan-Wasser) mit 60 % Ausbeute durchgeführt werden kann⁹⁶⁾, sollte sich die SeO_2 -Oxydation auch auf das 2-Methyltetrahydropyranon-(4) übertragen lassen. Hier ist allerdings zu beachten, daß die Carbonylfunktion zwei nicht äquivalente Seiten aktiviert und so ein sterischer Einfluß auf die Oxydationsrichtung ausgeübt wird. Zudem liegt hier kein carbocyclisches System vor, so daß der elektronegative Sauerstoff ebenfalls die Oxydation beeinflussen kann.

So ist auch das Beispiel des 3-Methylcyclohexanons, das bei der SeO_2 -Oxydation 3-Methylcyclohexandion-(1,6) gibt⁹⁷⁾, im Hinblick auf die Oxydationsrichtung nicht ohne weiteres auf das Methylpyranon-System zu übertragen.

Wir haben die SeO_2 -Oxydation in Dioxan zunächst bei Raumtemperatur durchgeführt, dann nach 2 h kurz zum Rückfluß erhitzt. Die Lösung wurde vom gebildeten Se rötlich, was für eine positive Reaktion sprach. Nach der Aufarbeitung wurde ein leicht rotbraunes Öl isoliert (45 % d.Th.). Die Farbe rührt von mitgeschlepptem Se her. Dieses Öl wurde an einer neutralen Kieselgelsäule (Aktiv. I) mit Äther in zwei schwach gelbe Zonen aufgetrennt, wobei die Hauptkomponente (98 % des auf

die Säule aufgegebenen Materials) nicht die für den Herzgiftzucker zutreffenden Reaktionen zeigte. Das Nebenprodukt der Oxydation (2 % des eingesetzten Materials) ergab aber nach der Isolierung die für den Herzgiftzucker zutreffenden Laufstrecke im Dünnschichtchromatogramm (siehe Abb. 20) ein identisches permethyliertes und silyliertes Derivat. Das Massenspektrum (Abb. 29) beweist nicht nur das Molekulargewicht im Massenpeak 128, sondern zeigt in der Fragmentierung auch das vergleichbare Verhalten wie der aus der MgCl_2 -Spaltung von Uscharidin erhaltene "Zucker".

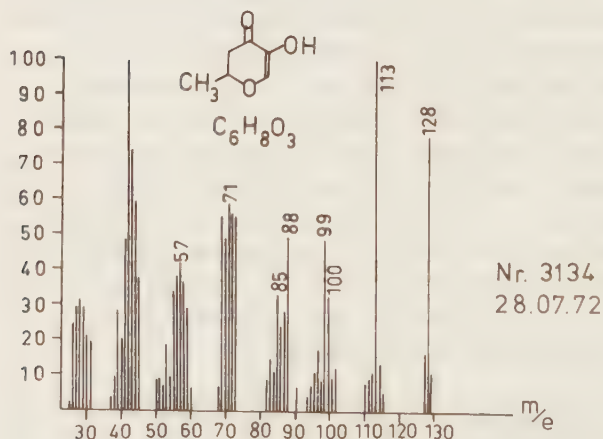


Abb. 29: Massenspektrum von 2-Methyldihydropyranon-(4)-ol-(5) (synth.)

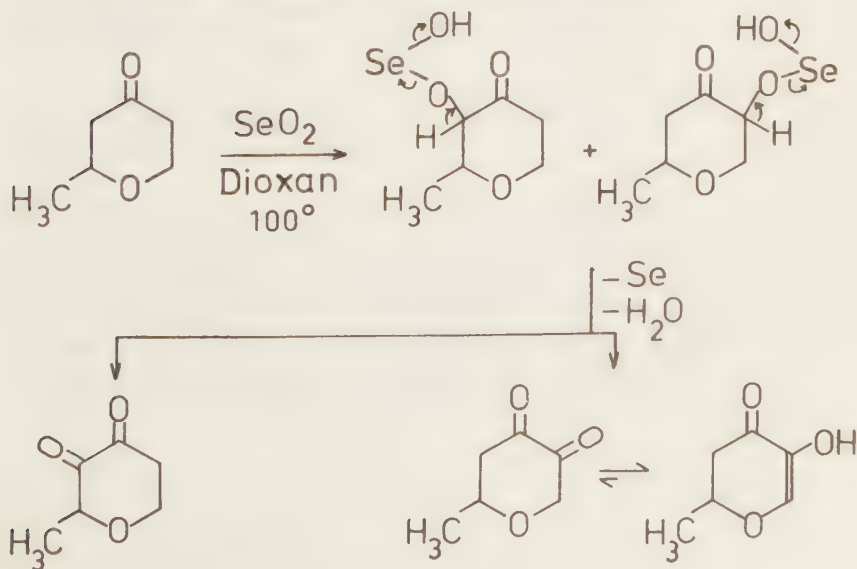
Einlaß-System: HTE 150 °C

Versuchsweise Zuordnung: M^+ = 128; 113 = $\text{M}-\text{CH}_3$;
 100 = $\text{M}-\text{CO}$; 99 = $100-\text{H}\cdot$; 88 = ? ; 85 = $113-\text{CH}_2 = \text{CH}_2$
 oder $100-\text{CH}_3$; 71 = $99-\text{H}_2\text{O}$; 57 = $85-\text{CO}$.

Wegen Substanzmangels konnte zusätzlich aber nur noch ein UV-Absorptionsspektrum aufgenommen werden. Das beobachtete $\lambda_{\max} = 208 - 209 \text{ m}\mu$ (in Äthanol) des $\pi - \pi^*$ Übergangs im α, β -ungesättigten Sechsring-Keton taucht hier ebenfalls wie im abgespaltenen "Zucker" des Uscharidins auf (siehe Abb. 21).

Die SeO_2 -Oxydation brachte also zumindest im Nebenprodukt der Oxydation ein positives Ergebnis. Die zur Carbonylfunktion α -ständige Methylengruppierung wurde in jedem Fall oxydiert. Beim 2-Methylpyrandion-(4,5) tritt nach der Oxydation noch eine Enolisierung einer Carbonylfunktion ein und man erhält damit die für den Herzgiftzucker postulierte Struktur II. Insgesamt ist die Reaktion nach dem von Corey und Schaefer⁹⁸⁾ postulierten Mechanismus gelaufen, wobei sich SeO_2 jeweils zwischen ein durch die Carbonylfunktion bewegliches α -H einschleibt und dann unter Wasser- und Selenabspaltung primär das Diketon ergibt. Das bei dieser Reaktion als Nebenprodukt anfallende 2-Methyltetrahydropyrandion-(4,5) reagiert dann zum Enol der Struktur II weiter.

Insgesamt ergab sich also folgendes Reaktionsbild:



Die Schwierigkeit bei den ersten Oxydationen und der anschließenden Isolierung der Dione waren nicht zu entfernende Se-Spuren, die selbst nach der Säulenchromatographie noch auftraten. Um auch noch diese Spuren aus dem Reaktionsprodukt zu entfernen, wurden in Übertragung des Verfahrens von Fieser und Ourisson⁹⁹⁾ am Boden der Säule Aluminiumgries eingefüllt, der dann in den weiteren Ansätzen bei der Elution Oxydationsprodukte ohne Se-Spuren als Verunreinigung ergab.

D. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Allgemeines

Schmelzpunkte wurden mit dem Monoskop VS Hans Bock gemacht. Sie sind unkorrigiert.

Die Verbrennungsanalysen führte Herr Zankl am hiesigen Institut aus, wofür an dieser Stelle herzlichst gedankt sei.

Die Infrarotspektren wurden mit dem Doppelstrahl-IR-Spektrographen Nr. 86 der Firma Leitz, Wetzlar, aufgenommen (Steinsalzoptik).

Als UV-Spektrometer stand das Spektrometer Leitz Unicam SP 800 zur Verfügung. Als Lösungsmittel dienten die optisch hochreinen Lösungsmittel (Uvasole) der Firma Merck, Darmstadt.

Die NMR-Spektren wurden an einem 60 MHz-Gerät der japanischen Firma Jeol vermessen.

Die optische Aktivität wurde am Polarimeter 141 der Firma Perkin-Elmer bestimmt.

Die Massenspektren wurden am Massenspektrometer Varian-MAT CH-4B, EFO-4B-Quelle, Elektronenstoß (70 eV), Direkteinlaß (bzw. HTE 150 °C), Beschleunigungsspannung 3 KV, Quellentemperatur 150 bis 180 °C aufgenommen. Für die Interpretation sei an dieser Stelle Herrn Dr. A. Haag besonders herzlich gedankt.

Zur Säulenchromatographie wurde in einem Fall Aluminium-oxid neutral verwendet, sonst ausschließlich Kieselgel, beides von der Firma M. Woelm, Eschwege. Die verwendete Aktivitätsstufe wird bei den einzelnen Versuchen angegeben.

Als Fraktionensammler wurde eingesetzt: Ultrarac Fraktionensammler Typ 7000, LKB-Produkte AB, Stockholm/Schweden.

Zur Dünnschichtchromatographie wurde Kieselgel G oder HF₂₅₄ nach Stahl der Firma Merck, Darmstadt, verwendet. Die Beschichtung der Platten wurde mit einem im Hause konstruierten automatischen Streichgerät durchgeführt. Zur präparativen Dünnschichtchromatographie wurden PSC-Fertigplatten Kieselgel F₂₅₄ der Firma Merck, Darmstadt, verwendet. Andere Materialien sind bei den jeweiligen Versuchen angegeben.

Zur Papierchromatographie wurde das Papier 2043 b der Firma Schleicher und Schüll verwendet. Die von Lettenbauer¹⁰⁰⁾ angegebenen Systeme konnten weitgehend übernommen werden. Besonders vorbehandelte Papiere werden bei den entsprechenden Versuchen vermerkt. Außer bei dem System Oktanol/Wasser wurde Formamid der Firma Merck als stationäre Phase verwendet.

Anfärbemethoden:

Die Herzgifte wurden bei der Papierchromatographie mit Kedde-Reagens sichtbar gemacht: Besprühen der Chromatogramme mit jeweils frisch bereiteter Lösung von 2 % methanolischer 3,5-Dinitrobenzoesäure und 1n wässriger KOH im Verhältnis 1 : 1.

Bei der Dünnschichtchromatographie wurden die Herzgifte mit Liebermann-Burchard Reagens (5 ml Acetanhydrid, 5 ml Schwefelsäure conc. in 50 ml Äthanol) besprüht und 15 bis 20 min bei 120 °C im Trockenschrank entwickelt. Die Identifizierung anderer Substanzen ist bei den jeweiligen Chromatogrammen angegeben.

Gaschromatographische Untersuchungen wurden am Gaschromatographen der Firma F u. M. (jetzt: Hewlett-Packard), Modell 5750 vorgenommen. Detektor: WLD. Trägergas: He. Die Säulen sind beim jeweiligen Trennproblem angegeben. Sie wurden selbst hergestellt.

Als Abkürzung für Herzgifte wurden im Anklang an frühere Arbeiten verwendet:

VU	= Voruscharin
UscH	= Uscharin
Ct	= Calotropin
Ctg	= Calotropagenin
Ud	= Uscharidin
Bxsr	= Boraxsäure.

2. Beschreibung der Versuche

- a) Aufarbeitung einer Milchsafprobe von *Calotropis gigantea* nach einem modifizierten Reichsteinschen Schema⁵¹⁾

Dazu wurden 1265 g Milchsaf von *Calotropis gigantea* in 2 l Äthanol eingeführt. Der abzentrifugierte Rückstand R₁ wurde noch zweimal mit 1,5 l Äthanol angerührt, dann mit Petroläther zur Entfernung der Amyrine (40,2 g) extrahiert. Die alkoholischen Extrakte wurden vereinigt,

wobei sich ein flockiger Niederschlag R_2 (16,32 g) bildete, der zweimal mit Äthanol/Wasser (5:1) gewaschen wurde. Der Alkohol-Extrakt wurde viermal mit je 1 l Petroläther ausgeschüttelt und mit Alkohol/Wasser (5:1) gewaschen; nach dem Einengen des alkoholischen Extraktes auf 3 l wurde sechsmal mit je 1 l Trichloräthylen extrahiert. Der Tri-Extrakt wurde ebenfalls eingengt; nach Zugabe von Aceton fiel Uscharin (krist.) mit Spuren Calotropin an (insgesamt 3,72 g). Ein Zweitkristallisat ergab 1,01 g Herzgift. Die Mutterlauge war ebenfalls kedde-aktiv. Der alkoholische Extrakt wurde schließlich mit Chloroform ausgeschüttelt; nach dem Abdampfen wurden 8,5 g herzgifthaltiges, braunes Pulver erhalten. Der eingedampfte Alkohol-Extrakt war eine braune Schmiere, die keine Kedde-Reaktion mehr gab. Es konnten Na^+ , Ca^{2+} , $C_2O_4^{2-}$, SO_4^{2-} und PO_4^{3-} nachgewiesen werden.

b) Aufarbeitung der Milchsafprobe von *Calotropis gigantea* nach einem schonenden Verfahren

1) Gefriertrocknung des Latex

Insgesamt standen aus zwei Sendungen zur schonenden Aufarbeitung 8,83 kg tiefgefrorener Milchsaf von *Calotropis gigantea* in fünf Polyäthylenflaschen mit Gummikorken zur Verfügung. Diese Flaschen wurden in vier Tagen vom Ursprungsland zum Untersuchungsort transportiert. Der aufgetaute Milchsaf bestand aus einer weißen Pflanzenmilch mit einem Bodensatz von zusammengeklumpten, hellen Teilen. Der lauchartige Geruch, ähnlich dem Saft von *Calotropis procera*, war auch hier festzustellen. Die Kapazität der Gefriertrocknungsanlage war mit einer Schalenfüllung von etwa

800 g Milchsaft erreicht. Der Trocknungsvorgang verlief bei einem Ölpumpenvakuum von 0,1 bis 0,5 Torr. Die durch einen Kryostaten erreichte Kondensatortemperatur betrug -50°C . Der Wasserverlust wurde aus der Differenz eingewogene Menge Milchsaft - aus gewogene Menge Trockensubstanz bestimmt. Insgesamt wurden 640 g graubraunes Pulver erhalten, das sich staubfein zermalen ließ. Spuren von Staub in der Nase verursachten einen heftigen Schnupfenanfall. Der durchschnittliche Wassergehalt des Milchsaftes von *Calotropis gigantea* betrug 93,6 %. Die unterschiedlichen Wassergehalte der Milchsaft-Chargen erklären sich durch die Inhomogenität des Milchsaftes. Im einzelnen wurden erhalten:

Charge	Milchsaft in g	Trockenzeit in h	Trockenmasse in g	Wassergehalt in %
1	563	50	41,5	92,6
2	807	40	44,3	94,5
3	791	36	40,0	94,9
4	793	36	66,7	91,6
5	720	36	52,3	92,7
6	680	36	51,9	92,4
7	775	36	63,0	91,9
8	780	36	61,4	92,1
9	803	36	50,0	93,8
10	790	36	62,0	92,1
11	795	36	59,6	92,5
12	533	36	47,3	91,2

Insgesamt wurden so 640 g Trockenmasse erhalten.

2) Extraktion der Amyrine

Das aus der Gefriertrocknung erhaltene graubraune Pulver wurde im Soxhlet in Portionen von maximal 70g mit je 1 l Petroläther extrahiert. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels blieben die Amyrine als gelbgrüne, in Methylenchlorid und Chloroform leicht lösliche, zähe Masse zurück. Nach 4- bis 6wöchigem Stehen an der Luft wurden 175 g einer wachsartigen Substanz erhalten (27,4 Gew.-% der eingesetzten Trockenmasse). An amyринfreier Trockensubstanz wurden 465 g eines rein weißen Pulvers erhalten. Im einzelnen wurden erhalten:

Charge	Trockenmasse in g	Extraktions- dauer in h	extrahier- te Trocken- masse in g	Amyrine in Gew.-%
1	49,6	72	36,1	27,2
2	53,7	84	38,0	27,3
3	58,3	96	42,2	27,6
4	65,0	96	47,1	27,4
5	62,7	96	45,4	27,5
6	66,1	96	48,0	27,4
7	64,8	96	46,8	27,4
8	63,2	96	45,8	27,5
9	67,1	96	48,5	27,3
10	67,5	96	49,0	27,4
11	22,0	96	15,6	27,4

3) Vortrennung der Herzgifte

Vorversuch:

1 g Trockensubstanz wurde mit je 225 ml Lösungsmittel aus der Reihe Tetrachlorkohlenstoff, Benzol, Äther, Trichloräthylen, Chloroform, Aceton, Alkohol in Portionen zu 75 ml jeweils 15 min auf dem Magnetrührer bei Raumtemperatur extrahiert. Nach dem Abfiltrieren, bzw. bei Chloroform Abzentrifugieren, wird abgedampft und der Rückstand mit Hilfe von Dünnschicht- und Papierchromatographie untersucht. Als Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie wurden Chloroform und Essigester/Methyläthylketon verwendet. Letzteres ergab eine bessere Auftrennung auch der polareren Stoffe. Von den acht untersuchten Systemen erwies sich die Lösungsmittelreihe Benzol, Chloroform, Chloroform/Äthanol (1:1), Wasser für eine Vortrennung der Herzgifte am günstigsten. Der wasserunlösliche Rückstand war rein weiß.

Extraktion der Herzgifte (Vortrennung):

239,5 g Trockensubstanz wurden in einem 3 l Erlenmeyer-Kolben mit je dreimal 2 l Benzol, Chloroform, Chloroform/Äthanol (1:1) und Wasser extrahiert. Die Extrakte eines jeweiligen Lösungsmittels wurden abfiltriert bzw. abzentrifugiert, zusammengefaßt und eingedampft. Der benzolische Auszug (23,5 g) stellte nach 4tägigem Trocknen im Vakuum über Paraffinspänen eine dunkelbraune, zähe Masse dar. Der Chloroform-Auszug (27,4 g) fiel nach 3tägigem Trocknen im Vakuum als hellbraunes Pulver an. Der Chloroform/Äthanol-Extrakt (36,9 g) war erst nach 14tägigem Trocknen im Vakuum über CaCl_2 zu pulverisieren. Der wässrige Extrakt (21,8 g) stellte nach dem Trocknen eine hellbraune,

bröckelige Masse dar. Der Rückstand (128,8 g) war rein weiß. Es konnten darin Na^+ , Ca^{2+} , $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ und PO_4^{3-} nachgewiesen werden. Insgesamt wurden also erhalten:

Benzol-Extrakt : 23,5 g d.i. 9,9 % der Ausgangs-
substanzen

Chloroform-
Extrakt : 27,4 g d.i. 11,5 % der Ausgangs-
substanzen

Chloroform/
Alkohol-
Extrakt : 36,9 g d.i. 15,4 % der Ausgangs-
substanzen

wässriger
Extrakt : 21,8 g d.i. 9,2 % der Ausgangs-
substanzen

Rückstand
(herzgift-
frei) : 128,8 g d.i. 53,9 % der Ausgangs-
substanzen

4) Säulenchromatographie des benzolischen Auszugs

700 g Kieselgel der Aktivitätsstufe V in Benzol eingeschlämmt, wurden in eine 1 m lange Säule gegeben. Hierbei muß auf Homogenität des Säulenmaterials und auf Ausschluß von Luftblasen geachtet werden. Dann werden 10 g des benzolischen Auszugs auf 40 g Kieselgel gleicher Aktivität niedergeschlagen, zerrieben und auf den Säulenkopf aufgebracht. Danach wurde mit Seesand abgedeckt und nach der Methode der Gradientelution⁵³⁾ aufgetrennt. Die im Fraktionensammler anfallenden Fraktionen von 160 bis 165 ml wurden, wenn möglich sofort, mit Dünnschicht- und Papierchromatographie untersucht. Eine Detektion mit Hilfe eines Refraktometers ist u. a. wegen der dauernden Änderung der Zusammensetzung

des Elutionsmittels nicht möglich. Alle Fraktionen, die nach den eingesetzten chromatographischen Methoden identisch waren, wurden zusammengefaßt und eingedampft. Für die Dauer der Trennung sind bei einem Dauerbetrieb der Säule (zur Verhinderung von Diffusion in der Säule) ca. 9 bis 10 Tage anzusetzen. Als ein Trennbeispiel sei folgende Säulentrennung angeführt:

Eingesetzt:	10 g Substanz auf 15 g $\text{SiO}_2(\text{V})$ niedergeschlagen
Säulenfüllung:	700 g Kieselgel (Aktiv. V)
Säulenhöhe:	1 m
SäulenØ:	4,5 cm
Lösungsmittelreihe:	Benzol, Chloroform, Essigester, Äthanol, Äthanol/Wasser (1:1), Wasser

- Tabelle siehe nächste Seite -

Fraktionen	mg Substanz	Herzgifte	Bemerkungen
1 - 2	117	-	gelbes Öl
3 - 5	3073	-	helles Harz
6 - 10	646	-	farblose Masse
11 - 15	31	-	farblos, ölig
16 - 17	10	-	farblos, ölig
18 - 24	195	-	hellbraun, harzig
25 - 32	300	-	hellbraun, halbfest
33 - 36	521	-	braun, harzig
37 - 39	406	-	braun, hochviskos
40 - 42	49	-	braun, amorph
43 - 45	52	-	braun, amorph
46 - 47	117	VU	farblos, amorph
48	182	VU, Amyrine	hellgelb, amorph
49 - 51	1204	Usch	farblos, teilweise krist.
52 - 54	158	Usch	hellbraun, amorph
55 - 56	37	Usch, Ct	hellbraun, amorph
57	18	Ct	farblos, amorph
58 - 60	756	Ct, Verunr.	hellbraune Plättchen
61 - 63	205	Ct, Genin	braungrün, ölig
64 - 73	401	-	braun, halbfest
74 - 95	474	-	braun, amorph
HCO ₃ -	5	-	dunkle Schmiere
Extrakt			

Insgesamt eluierte Substanz: 9,02 g

Der gesamte Säuleninhalt wurde nach der Elution mit 1 l 5%iger NaHCO_3 -Lösung extrahiert, der Extrakt angesäuert und mit Chloroform/Äthanol (4:1) ausgeschüttelt, abgedampft und auf die von Hassal⁴⁰⁾ gefundene Boraxsäure untersucht; diese konnte nicht bestätigt werden.

5) Säulenchromatographie des Chloroform-Extraktes

Die Bereitung der Säule sowie Elutionszeit und Lösungsmittelreihe waren jeweils analog wie beim benzolischen Extrakt. Es wurden jeweils 10 g Substanz aufgetrennt. Beispiel einer Trennung:

Fraktion	mg Substanz	Herzgifte	Bemerkungen
1-2	154	-	gelbes Öl
3-5	73	-	helles Harz
6-11	59	-	gelbbraunes Harz
12-16	44	-	hellgelbes Harz
17-18	10	-	helles Harz
19-20	10	-	farbloses Öl
21-25	11	-	hellbraunes Harz
26-34	13	-	orangefarben, harzig
35-39	31	-	hell, wachsartig
40-46	36	-	helles Harz
47-51	9	-	dunkelbraun, halbfest
52-59	815	-	braunes Pulver
60-79	74	-	amorph, braun
80-82	34	-	hellbraun, amorph

- Fortsetzung nächste Seite -

Fortsetzung:

Fraktion	mg Substanz	Herzgifte	Bemerkungen
83-86	123	VU	dunkelbraun, amorph
87-89	100	VU	hellgelbes Pulver
90-98	1003	VU, Usch	hellgelb, amorph
99-100	554	Usch	gelbgrün, amorph
101-102	663	Usch	hellgelbes Pulver
103-109	2599	Usch	farblos, teilw. krist.
110-119	779	Usch	farbloses Pulver
120-122	164	Usch, Ct	farblos, teilw. krist.
123-124	129	Ct	farblos, krist.
125-126	159	Ct	amorph, leicht verunr.
127-131	694	Ct	hellbraunes Pulver
132	193	<u>Ct</u> , Ctg	farblos, amorph
133-134	418	<u>Ctg</u> , Ct	braun, sirupös
135-144	783	Ctg	dunkelbraun, zäh
145-151	165	-	dunkelbraunes Öl
152-164	549	-	grünes Pulver
165-172	61	-	braun, amorph
173-183	42	-	hellbraunes Pulver
184-195	32	-	braunes Pulver
wssrg.	37	-	braune Plättchen

Extr.

Insgesamt wurden 10,66 g eluiert. Die überschüssigen 0,66 g dürften auf mitgerissenes Kieselgel zurückzuführen sein. Die Boraxsäure wurde analog wie beim benzolischen Extrakt gesucht; das Ergebnis von Hassal konnte nicht bestätigt werden.

6) Säulenchromatographie des Chloroform/Alkohol-Extraktes

Die Bereitung der Säule war analog zu den oben beschriebenen Auftrennungen. Bei der Lösungsmittelreihe wurde mit Chloroform begonnen, da es sich hier um einen polareren Extrakt handelt; danach kamen Essigester, Alkohol, Alkohol/Wasser (1:1), Wasser und 5%ige NaHCO_3 -Lösung. Die Elutionsdauer betrug 8 bis 9 Tage.

- Tabelle siehe nächste Seite -

Insgesamt wurden aus 30,0g Latex-Extrakten 10,685 g (35,66%) herzigifhaltiges Material isoliert. Davon in chromatographisch reiner Form:

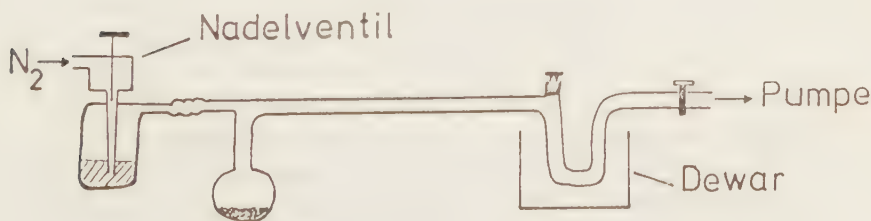
728 mg	VU
4,427 g	Usch
1,0 g	Ct

Fraktionen	mg Substanz	Herzgifte	Bemerkungen
1-9	201	-	gelbes Öl
10-13	54	-	hellbraun, wachsartig
14-19	414	-	dunkelbraunes Harz
20-23	75	-	braunes Pulver
24-26	30	-	dunkelbraun, zäh
27-29	14	-	braunes Pulver
30-33	44	-	hellbraun, krist.
34-40	388	VU	gelbbraun, amorph
41-44	283	VU, <u>Usch</u>	hellbraun, teilw.krist.
45-54	470	Usch	hellbraun, teilw.krist.
55-59	307	Usch, <u>Ct</u>	farblos, amorph
60-70	467	<u>Ct</u> , Usch	braun, amorph
71-77	373	Ct, Amyrine	braunes lockeres Pulver
78-80	389	Ct, Ctg	braun, amorph
81-93	970	Ctg	braun, amorph
94-98	175	-	dunkelbraun, amorph
99-101	189	-	grün, wachsartig
102-103	148	-	braunes Öl
104-108	224	-	dunkelbraune Schmiere
109-138	1305	-	schwarzbraun, amorph
HCO ₃ ⁻	25	-	dunkle Schmiere
Extrakt			

Die Differenz von 3,41 g, die nach Summierung der Einzelextrakte auftritt, ist auf Verunreinigungen in dem dunkelbraunen Extrakt zurückzuführen, da diese braun gefärbten Substanzen in keiner Auftrennung, auch mit Alkohol und Wasser, zu eluieren waren. Bei diesen Substanzen handelt es sich um keine Herzgifte, da nach beendeter Elution der Säuleninhalt keine Kedde-Reaktion gab. Die Suche nach der Boraxsäure erfolgte analog zu obigen Auftrennungen; das Ergebnis von Hassal konnte wiederum nicht bestätigt werden.

c) Brenzung des Calotropins

Die von G. Hesse³⁵⁾ beschriebene Apparatur wurde soweit verändert, als vor den Brenzkolben ein Nadelventil geschaltet wurde, wodurch der Stickstoffstrom reguliert und in einer Siliconöl-Falle optisch verfolgt werden kann. Zusätzlich ist am Knie zum gekühlten U-Rohr ein Aufsatz angeschmolzen, wo die Brenzprodukte unter Stickstoff herausgenommen oder mit Lösungsmittel ausgespült werden können. Die genaue Apparatur ist aus der Skizze zu entnehmen:



Die Apparatur wird vor dem Experiment mit Stickstoff gespült, dann die Ölpumpe angeschlossen und im schwachen N_2 -Strom das 230 bis 240 °C heiße Ölbad hochgefahren.

Der Druck muß konstant mindestens 0,05 Torr. betragen. Zur Verbesserung der Wärmeübertragung in der Calotropin-Schmelze wurden Glasperlen (1,0 bis 1,2 mm $\varnothing$) mit in den Brenzkolben gegeben. Es wurden zwischen 100 und 120 mg Calotropin eingesetzt. Die hellen Kristalle der Herzgiftmethylreduktinsäure wurden unmittelbar nach dem Brenzen unter N_2 zur massenspektroskopischen Untersuchung aus dem Aufsatz entnommen.

d) Girard-Spaltung von Uscharin

1. Ansatz:

4 g Uscharin (kann leicht verunreinigt sein) werden in 50 ml Methylenchlorid und 50 ml Methanol gelöst. Dazu gibt man 1,2 g Girard T und 5 ml Eisessig. Dieses Gemisch läßt man 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen. Dazu gibt man dann 100 g zerstoßenes Eis, 9/10 der zur Neutralisation erforderlichen NaOH und 200 ml Wasser. Diese Lösung wird nun zur Entfernung der Neutralstoffe bzw. nicht umgesetzten Uscharins 4mal mit je 150 ml Methylenchlorid ausgeschüttelt. Der Extrakt wurde einmal mit n/10 Schwefelsäure und 2mal mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird mit Hilfe der Papierchromatographie untersucht und im 2. Ansatz nochmals mit einem Überschuß an Girard T umgesetzt.

Die wässrige Lösung der Girardverbindung des Uscharins wurde nun zersetzt: sie wird mit verdünnter Salzsäure auf $p_H = 2,5 - 3,0$ gebracht und mindestens eine Stunde stehen gelassen. Dann wird 8mal mit je 150 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die wässrige Phase soll dann herzgiftfrei sein. Die vereinigten Chloroform-Extrakte werden je 1mal mit 50 ml 1n Schwefelsäure, 1mal mit 50 ml 1n $NaHCO_3$ -Lösung und 2mal mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen mit Na_2SO_4 wird eingedampft und der Rückstand

aus Chloroform (im großen Überschuß) oder Chloroform/Äthanol (95:5) umkristallisiert. So wurden bis zu 669 mg reines Uscharidin isoliert. Nach dem Einengen der dunklen Mutterlauge wurden weitere 106 mg Uscharidin erhalten.

2. Ansatz:

Die nicht umgesetzten Teile wurden nun mit 3,5 g Girard T in 50 ml Methylenchlorid und 50 ml Methanol gelöst 40 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend 1 Stunde gerückflußt. Die Aufarbeitung war analog wie beim 1. Ansatz. An Neutralstoffen waren noch bis zu 623,5 mg vorhanden. Das Uscharidin wird 6mal mit je 150 ml Chloroform ausgeschüttelt. Es wurden bis zu 1,7 g reines Uscharidin und 109 mg Uscharidin aus der Mutterlauge erhalten. Die wässrige Lösung enthielt noch Spuren von Herzgift, das aber auch durch weiteres Ausschütteln nicht extrahiert werden konnte. Aus der eingedampften wässrigen Lösung des 1. Ansatzes liegt neben Resten von Girard T der Mercaptoaldehyd bzw. sein Oxydationsprodukt, das Disulfid vor. Mit J_2 -Lösung kann vollständig oxydiert und das DNP-Derivat ausgefällt werden.

e)

1) Spaltung von Uscharidin mit $MgCl_2 \cdot Et_2O$ in Methanol (abs.)

530 mg Uscharidin (1 mmol) werden in 50 ml Methanol (abs.) gelöst. Dazu wird unter N_2 500 mg $MgCl_2 \cdot Et_2O$ (101) zugegeben und 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Spaltung kann mit Hilfe von Dünnschicht- und Papierchromatographie verfolgt werden. Danach werden 100 ml Chloroform (dest.) zugegeben und das Gemisch 3mal mit je 25 ml Wasser ausgeschüttelt. Die vereinigten wässrigen Auszüge werden noch 2mal mit Chloroform extrahiert.

Die wässrige Phase wird sofort eingefroren und unter den Bedingungen der bereits bei der Milchsauftaufarbeitung beschriebenen Gefriertrocknung das Wasser entfernt. Der erhaltene farblose Rückstand muß unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluß aufbewahrt werden (hygroskopisch). Die Substanz ist so wochenlang im Kühlschrank unverändert haltbar.

Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und danach im Vakuum eingedampft. Der leicht gelbe Rückstand wird an einer Kieselgel-Säule gereinigt. Die Bedingungen sind aus nachfolgender Tabelle zu entnehmen. Zusammengefaßte Fraktionen ergaben sich aus gleichlaufenden Chromatogrammen.

Säulenlänge:	1 m
SäulenØ :	1,5 cm
Säulenfüllung:	Kieselgel (Woelm), Aktiv. IV
elutrope Reihe:	Chloroform $\longrightarrow$ Essigester
eingesetzt:	800mg Substanz (aus zwei Ansätzen), auf Kieselgel niedergeschlagen.

- Tabelle siehe nächste Seite -

Fraktionen	isolierte Menge in mg	Herzgift	Bemerkungen
1-10	82	-	hell, wachsartig
11-20	36	-	hell, wachsartig
21-30	35	-	hell, wachsartig
31-40	19	-	hell, wachsartig
41-50	16	+(sehr schwach)	hell, teilw. krist.
51-58	35	+(schwach)	gelb, ölig
59-71	31	+	gelb, amorph
72-85	53	+	gelb, krist.
86-97	312	+	farblos, krist.
98-102	68	+	farblos, krist.
103-119	13	-	farblos, amorph
120-150	19	-	hellbraune Schmiere

Die herzogiftaktiven Fraktionen 51-58, 59-71 und 72-85 waren chromatographisch nicht einheitlich und wurden nicht weiter untersucht. Die Fraktionen 86-97 und 98-108 dienten zur weiteren Untersuchung (Schmp. 207°C , $\alpha_{\text{D}}^{18} = -30,1^{\circ} \pm 3,0^{\circ}$ in Äthanol).

$\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_6$ (432)	C %	H %
gef.:	69,21	8,15
ber.:	69,44	8,33

2) Spaltung von Calotropin mit $\text{MgCl}_2 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ in Methanol(abs.)

53,2 mg (1/10 mmol) Calotropin werden in 8 ml Methanol(abs.) gelöst. Dazu wird unter N_2 50 mg $\text{MgCl}_2 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ zugegeben und 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach der chromatographischen Kontrolle wurde keine Umsetzung erreicht. Danach wurde 8 Tage auf 40°C erwärmt und, wie bei der Uscharidin-Spaltung beschrieben, aufgearbeitet. Es wurde wiederum nur das Ausgangsmaterial isoliert.

3) Spaltung von Uscharidin mit $\text{MgCl}_2 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ in Äthanol(abs.)

Absatz: 530 mg Uscharidin, 50 ml Äthanol(abs.),

500 mg $\text{MgCl}_2 \cdot \text{Et}_2\text{O}$

Reaktionsbedingungen und Aufarbeitung wie bei der Uscharidin-Spaltung in Methanol(abs.).

Aus der organischen Phase wurde 385 mg gelbes, herzgift-aktives Rohmaterial isoliert, das an Kieselgel gereinigt wurde. Die Bedingungen sind aus nachfolgender Tabelle zu entnehmen. Zusammengefaßte Fraktionen ergeben sich aus gleichlaufenden Chromatogrammen.

Säulenlänge:	1 m
SäulenØ:	1,5 cm
Säulenfüllung:	Kieselgel (Woelm), Aktiv. IV
eluotrope Reihe:	Chloroform/Essigester (3:1) $\longrightarrow$ Essig-
eingesetzt:	385 mg Substanz, auf Kieselgel ester niedergeschlagen.

Fraktionen	isolierte Menge in mg	Herzgift	Bemerkungen
1-32	13	-	hellbraune Schmiere
33-47	28	-	hellgelb, amorph
48-83	17	-	farblos, amorph
84-89	27	-	farblos, glasig
90-102	25	+(schwach)	farblos, amorph
103-108	13	+	gelb, glasig
109-112	89	+	farblos, glasig
113-117	141	+	farblos, krist.
118-123	12	+(sehr schwach)	hellgelb, amorph
124-130	9	-	gelb, ölig

Die Fraktionen 90 - 102 und 103 - 108 waren chromatographisch nicht einheitlich und wurden nicht weiter untersucht. Die Fraktionen 109 - 112 und 113 - 117 wurden zusammengefaßt.

(Schmp.: 149 - 150 °C, $\alpha_D^{18} = -34,0^\circ \pm 3,0^\circ$ in Alkohol).

<u>C₂₇H₄₀O₆</u> (460)	C %	H %
gef.:	69,87	8,91
ber.:	70,43	8,69

4) Spaltung von Uscharidin mit $\text{MgCl}_2 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ in
i-Propanol(abs.)

530 mg Uscharidin werden in 70 ml i-Propanol(abs.) bis zur Bildung einer milchigen Suspension gerührt. Dann werden unter N_2 500 mg $\text{MgCl}_2 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ zugegeben. Nach 4 Stunden wird die Lösung fast farblos. Da die dünnschichtchromatographische Kontrolle noch keinen vollständigen Reaktionsablauf zeigt, wird nach 24 Stunden für 2 Stunden auf 40°C erwärmt. Gegen Ende der Reaktion färbt sich die Lösung wieder milchig trüb. Danach wird in der üblichen Weise aufgearbeitet. Aus der organischen Phase wurden so 355 mg herzigifthaltes Material erhalten. Im Papierchromatogramm (stat. Phase: Formamid Laufmittel: Benzol/Chloroform 1:1) werden zwei verschiedene Spaltprodukte sichtbar gemacht.

Dünnschichtchromatographische Isolierung der Spaltprodukte: Zum Gießen der präparativen Dünnschichtplatten wird eine 40mal 20 cm Platte mit einer Schaumstoffunterlage in den Gießrahmen gelegt und mit 160 ml Suspension eingegossen, die man aus 64 g Kieselgel PF_{254} (Merck) und 130 ml Wasser bereitet. Die Platten wurden an der Luft vorgetrocknet und danach 1 Stunde im Trockenschrank bei 120°C aktiviert. Dann wurden 34 mg des erhaltenen herzaktiven Gemisches in 5 ml Chloroform/Methanol (1:1) gelöst in einer Linie aufgetragen und zweimal mit Essigester/Aceton (9:1) entwickelt. Die beiden unter dem UV-Licht sichtbaren Zonen werden gekennzeichnet, abgeschabt und das jeweilige Herzgift in einer kleinen Sküle mit Methanol eluiert. Das Lösungsmittel wird abgedampft. Man isoliert so aus der unteren Schicht 3 mg Herzgift (Schmp. $224 - 225^\circ\text{C}$). Aus der oberen Schicht wurden 13 mg (Schmp. $236 - 237^\circ\text{C}$, $\alpha_{\text{D}}^{18} = -30,0 \pm 3,0^\circ$ in Äthanol) in papierchromatographisch reiner Form isoliert.

f)

1. Gefriertrocknung der wässrigen Phase

Die vereinigten, mit Chloroform gewaschenen wässrigen Extrakte (75 ml) wurden sofort nach der Aufarbeitung der MgCl_2 -Spaltung in flachen Aluminiumschalen eingefroren und der Gefriertrocknung unterworfen. Das Ölpumpenvakuum betrug 0,1 bis 0,5 Torr, die Kondensatortemperatur - 50 °C. Nach 36 Stunden sind bei einem 1 mmol-Ansatz zwischen 606 und 625 mg einer farblosen, flaumigen Massen entstanden. Nach dem vorsichtigen Belüften der Apparatur muß die gefriergetrocknete, äußerst hygroskopische Masse unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluß aufbewahrt werden.

Beispiel einer MgCl_2 -Spaltung in Methanol:

eingesetzt: 530 mg Ud

500 mg $\text{MgCl}_2 \cdot \text{Et}_2\text{O}$

1030 mg

zurück-
gewonnen : 419 mg aus der org. Phase

608 mg aus der wässrigen Phase

1027 mg

2. Dünnschichtchromatographie des Herzgiftzuckers

Hier wurden alle Versuche mit Fertigfolien gemacht. Als bestes Material erwies sich die Fertigfolie Polygram Sil G (Marcherey und Nagel). Nach dem Auftragen verschiedener konzentrierter Lösungen und Desoxyzuckern als Vergleichssubstanzen wurde zweimal mit Essigester/1-Propanol/Wasser (63:25:12) laufen gelassen. Nach dem Trocknen der

Platte wurde mit einer wässrigen 0,1 % HJO_5 -Lösung zur Oxydation der aufgetragenen Substanzen besprüht und mit 3,5-Diaminobenzoessäure -hydrochlorid nachbehandelt, wobei grüngelb fluoreszierende Flecken bereits bei Raumtemperatur auftreten.

Eine Übertragung in den präparativen Maßstab war nicht möglich, da das verwendete Plattenmaterial einen organischen Binder enthält.

3. DNP des Herzgiftzuckers

50 mg des aus der Gefriertrocknung erhaltenen Materials werden in 8 bis 10 ml Wasser gelöst und leicht erwärmt. Mit 2 n salzsaurer, wässriger DNP-Lösung (nicht phosphorsaurer Lösung) wird durch tropfenweises Zugabe nach 10 Minuten ein gelbes DNP erhalten, das aus Wasser umkristallisiert werden kann (Schmp.: 220 - 221 °C Zers.).

Papierchromatographie:

Das Papier 2043 b (Schleicher und Schüll) wird mit Formamid imprägniert. Dazu wird das Papier mit gleichmäßiger Geschwindigkeit durch eine frischbereitete 30%ige Lösung von Formamid und Aceton gezogen und abgepreßt. Nach dem Auftragen wird mit Dimethylformamid/ NH_3 conc (1:1) aufsteigend entwickelt, wobei die DNP's als intensiv blaue Flecken laufen, die schon nach kurzer Zeit an der Luft verblassen.

Dünnschichtchromatographie:

Hierzu werden selbstgestrichene Platten verwendet. Als Streichmasse dient eine Suspension aus 30 g Kieselgel H (Merck) in 70 ml Wasser. Die Beschichtung erfolgt an einem im Hause konstruierten Streichgerät. Wenn die

Schicht durch Lufttrocknung matt geworden ist, werden die Platten 45 min bei 120 °C im Trockenschrank aktiviert. Nach dem Auftragen verschieden konzentrierter DNP-Lösungen wird mit Benzol/Aceton (44,5:55,5) entwikkelt.

4. Silylierung des Herzgiftzuckers

a) mit Hexamethyldisilazan

In einem kleinen, mit einer Gummimembran verschließbaren Reaktionsgefäß werden 20 mg des aus der Gefrier-trocknung erhaltenen Materials nach der von C. C. Sweeley et al.⁸³⁾ als Standardmethode angegebenenem Verfahren silyliert. Aus der erwärmten Reaktionslösung werden nach 5 min vorsichtig 0,5 µl aus der überstehenden, klaren Lösung abgezogen und in die mit Hexamethyldisilazan vor-behandelte Säule eingespritzt.

b) mit N,O-Bis(-trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA)

Auf 8 bis 10 mg sorgfältig getrockneten Rückstand der wässrigen Phase der Spaltung werden in einem abschließbaren Glas (Reacti Vial der Firma Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois (USA)) 50 µl BSTFA (Serva Feinbiochem., Heidelberg) und 30 µl Pyridin (über KOH getrocknet) zusammengegeben. Dazu werden aus einer Spritze langsam 20 ml Trimethylchlorsilan (Merck, Darmstadt) zugetropft, danach kurz durchgeschüttelt und 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach einem kurzen Erwärmen auf 40 °C läßt man das gebildete, mikrokristalline NH_4Cl absetzen und entnimmt für die gaschromatographische Untersuchung aus der überstehenden, klaren Lösung 0,5 µl, ohne den Bodensatz aufzurühren.

Analog wurde die synth. Methylreduktinsäure²²⁾ als Vergleichssubstanz silyliert und gaschromatographisch untersucht.

c) Gaschromatographie

Es wurde das F + M-Modell 5750 mit Wärmeleitfähigkeitsdetektor benutzt. Als Säulen dienten Edelstahlsäulen 2mal 2 m 1/4" mit 20 % Polyäthylenglykol 12000, auf Kieselgur 0,2 mm, belegt.

Trärgas: Helium 40 ml/min. Die Säule wurde mit Silylierungsmittel vorbehandelt. Temperaturprogramm 130 °C (5 min) → 180 °C, (15 min); Aufheizrate 6 °C/min.

5. Umsetzung mit Bortriäthyl

a) Methylreduktinsäure und Bortriäthyl

Im Schlenkrohr wird zu 87 mg Methylreduktinsäure²²⁾ unter getrocknetem Stickstoff 1 ml Bortriäthyl (Kalichemie, Hannover) unter den nötigen Vorsichtsmaßnahmen zugegeben. Nach dem Hinzufügen eines Tropfens Neopentylcarbonsäure als Katalysator beginnt bei Raumtemperatur nach 10 min ein leichtes Gasen. Nach einer Stunde ist die gesamte Methylreduktinsäure in Lösung gegangen. Nach einem kurzen Erwärmen auf 40 °C wird das überschüssige Bortriäthyl an einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Aus dem leicht braunen, hochviskosen Rückstand wird bei 110 °C/0,1 Torr ein angenehm fruchtartig riechendes Öl absublimiert, das sofort massenspektrometrisch untersucht wird.

b) Herzgiftzucker und Bortriäthyl

50 mg des Gefriertrocknungsrückstandes der $MgCl_2$ -Spaltung werden mit trockenem Pyridin geschüttelt. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels wird ein mit dem Herzgiftzucker

angereichertes weißen Pulver erhalten, das wie oben beschrieben mit Bortriäthyl umgesetzt wird. Die Reaktion verläuft unter Gasentwicklung und leichtem Erwärmen. Aus dem dunkelbraunen, wachsartigen Rückstand wird bei $110^{\circ}\text{C}/0,1$ Torr ebenfalls ein angenehm riechendes, farbloses Öl absublimiert, das sofort massenspektrometrisch untersucht wird.

6. Permethylierungsversuche

a)

84 mg Gefriertrocknungsrückstand werden in 3 ml Dimethylformamid und 0,7 ml Methyljodid gelöst. Nach dem Vorschlag von R. Kuhn et al.⁸⁸⁾ werden 0,8 g Bariumoxid und 20 mg Bariumhydroxid unter Rühren hinzugegeben. Nach 16 Stunden hat sich die Reaktionslösung braun gefärbt. Danach wird das Reaktionsgemisch mit 10 ml Wasser versetzt und die wässrige Lösung 3mal mit 20 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels ($70^{\circ}\text{C}/16$ mm) am Rotationsverdampfer bleibt ein braunes Öl (12 mg).

b) Präparative Dünnschichtchromatographie

Bei der eingesetzten Substanzmenge muß man beachten, daß Kieselgel Spuren von Verunreinigungen enthält, welche die zu isolierende Substanz beeinflussen und das chromatographische Ergebnis verfälschen können. Deshalb wurde eine 20mal 20 cm PSC-Fertigplatte Kieselgel F₂₅₄ (E. Merck, Darmstadt) mit dem späteren Laufmittel Äther/Toluol (67:33) 20 cm hoch blind entwickelt und anschließend 25 min bei 110°C im Trockenschrank getrocknet. Dann wurden im rechten Winkel zur ersten Laufrichtung 12 mg des in Benzol gelösten permethylierten

Produktes in einer Linie aufgetragen und 1mal mit obigem Laufmittel entwickelt. Nach 15minütiger Behandlung mit J_2 -Dampf wurde eine gelbe Zone ($R_f=0,15$) sichtbar, die an der Luft schnell wieder verblaßte. Nach dem Abschaben und Extrahieren der Schicht mit Äther/Benzol (1:1) wurden 8 mg eines schwach gelben Öls erhalten.

In einem weiteren Ansatz wurden 10 mg der später synthetisierten Verbindung II unter den gleichen Bedingungen permethyliert. Nach der präparativen Dünnschichtchromatographie wurden 7 mg farbloses Öl erhalten. Ein Vergleich der beiden Verbindungen ergab im Dünnschichtchromatogramm gleiche Laufstrecken mit Äther/Toluol (67:33).

c) Gaschromatographie

Am Gaschromatographen F + M, Modell 5750 (WLD) mit 2mal 2 m Edelstahlsäulen $1/4''$, die mit 20 % Didecylphthalat auf Kieselgur 0,10 bis 0,25 mm belegt sind, wurde bei isothermer Ofentemperatur (180°C) die Einheitlichkeit der Produkte bestätigt. Die Proben müssen wegen ihrer großen Viskosität in Benzol gelöst eingespritzt werden.

7. Darstellung von 2-Methyldihydropyranon-(4)-ol(5)

a) Vinylacetylid

In einem 1 l-Einhalskolben werden etwa 750 ml NH_3 einkondensiert. Vor der Natriumzugabe wird unter Rühren am Magnetrührer eine Spatelspitze Eisen-(III)-nitrat zugegeben. Die vorher farblose Lösung wird rotbraun. Dazu wird unter sorgfältig getrocknetem Stickstoffstrom 34,5 g Natrium vorsichtig in kleinen Portionen

zur Bildung der "blauen Lösung" zugegeben. Nach starkem Rühren und gelegentlichen Eintauchen des Kondensationskolbens in flüssige Luft, um die starke Wasserstoffbildung unter Kontrolle zu halten, schlägt die blaue Lösung nach 15 bis 20 min in eine graue Natriumamid-Suspension um. Die heftige Wasserstoffentwicklung ist sofort beendet. Zur gebildeten Natriumamid-Suspension wird nun aus einem Tropftrichter 63 g (0,5 m) frisch destilliertes 1,4-Dichlorbuten-(2) (Ega Chemie, Steinheim) zugegeben. Hierbei ist zu beachten, daß die ersten Tropfen sehr langsam zugegeben werden, um eine zu heftige Reaktion zu verhindern. Die graue Suspension färbt sich anfangs grünlich, dann durch das gebildete Acetylid schwarz. Nach der Zugabe wird der Tropftrichter entfernt, und über Nacht läßt man das überschüssige Ammoniak bei Raumtemperatur über ein Quecksilberventil abdampfen.

b) Hexen-(1)-in(3)-ol(5)

Am nächsten Tag wird durch leichte Erwärmen des Kolbens das restliche Ammoniak abgedampft. Als Rückstand bleibt eine schwarze Kruste, die mit einem langen Spatel in 200 ml Äther suspendiert wird. Nach dem Hinzufügen von weiteren 200 ml Äther wird auf -20°C abgekühlt und aus einem Tropftrichter sehr langsam unter Rühren 22 g frisch destillierter Acetaldehyd dazugetropft. Nach weiterem 4stündigen Rühren läßt man das Reaktionsgemisch über Nacht stehen. Danach wird vorsichtig mit 100 g Eis zersetzt und schließlich mit verdünnter Schwefelsäure auf einen $p_{\text{H}} = 5,0$ bis $6,0$ angesäuert. Die wässrige Phase wird 4mal mit 200 ml Äther ausgeschüttelt und die vereinigten organischen Phasen werden mit Na_2SO_4 getrocknet. Dann wird am Rotationsverdampfer der Äther vorsichtig bis auf etwa 50 ml abgezogen und anschließend fraktioniert. Das Hexeninol geht bei $65^{\circ}\text{C}/22\text{ mm}$ als farbloses Öl über. Ausbeute 13,4 g (28 % d. Th.).

Zur Vermeidung von Polymerisationen muß das Öl in der Tiefkühltruhe aufbewahrt werden. Eine sofortige Weiterverarbeitung ist aber hier zu empfehlen.

$\frac{C_6H_8O}{(96)}$	C %	H %
gef.:	74,69	8,10
ber.:	75,0	8,33

c) 2-Methyltetrahydropyranon-(4)

100 mg Quecksilber(II)sulfat werden in 40 ml 10%iger Schwefelsäure gelöst und auf 60 °C erwärmt. Dazu werden unter Rühren langsam 5,6 g frisch destilliertes Alkeninöl eingetropft. Danach werden 5mal nach je 10 min jeweils 10 mg Quecksilber(II)sulfat dazugegeben. Nach 3 Stunden wird kurz zum Rückfluß erhitzt und nach dem Abkühlen 3mal mit 20 ml Äther extrahiert. Nach dem Trocknen der zusammengefaßten organischen Phasen mit Na_2SO_4 wird der Äther abgezogen und der ölige Rückstand im Wasserstrahlvakuum destilliert. $Kp_{18} 62-64$ °C, Ausbeute 4,5 g (68 % d. Th.).

d) 2-Methyldihydropyranon-(4)-ol(5)

1 g frisch bereitetes Selendioxid¹⁰²⁾ wird in 20 ml Dioxan gelöst. Dazu gibt man unter Rühren bei Raumtemperatur innerhalb von 5 min 2,3 g 2-Methyltetrahydropyranon-(4). Nach dem Abkühlen der rötlichen Suspension wird das gebildete Selen abfiltriert und anschließend das Lösungsmittel bei 40°C/18 mm am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand ist ein rotbraunes Öl (2,2 g), das über Kieselgel (Woelm) Aktiv. I, mit Äther eluiert wird. Um Selenspuren zu entfernen, ist am Boden der Säule eine Schicht Aluminiumgries eingefüllt. Die beiden

gelben Zonen werden gesondert aufgefangen und danach das Lösungsmittel abgezogen.

Isoliert: aus Zone I: 800 mg farbloses Öl (30,7 % d.Th.)
aus Zone II: 29 mg farbloses, amorphes Pulver
(1,1 % d. Th.) Schm.-Bereich 55-59°

Die Substanz aus Zone I ergibt keine FeCl_3 -Reaktion.

h) Aufarbeitung Uscharin-haltiger Fraktionen

10 g durch Dünnschichtchromatographie kontrollierte uscharinhaltige Fraktionen aus vorhergehenden Milchsafte-Aufarbeitungen werden auf 20 g Kieselgel (Woelm), Aktiv. V, niedergeschlagen.

An 700 g Kieselgel, Aktiv. V, in Chloroform eingeschlemmt, wird mit der elutropen Reihe Chloroform $\longrightarrow$ Essigester $\longrightarrow$ Alkohol eluiert. Die Bereitung der Säule erfolgte wie bereits bei der Auftrennung der Milchsafte-Extrakte beschrieben. Chromatographisch einheitliche Fraktionen wurden zusammengefaßt. Nach dieser Methode wurde die Säulenchromatographie zur Uscharin-Gewinnung mehrfach angewandt.

Ein Trennbeispiel ist in nachfolgender Tabelle angegeben. Für die Trennung waren 5 Tage anzusetzen.

- Tabelle siehe nächste Seite -

Fraktion	isolierte Menge in mg	Herzgift	Bemerkungen
1-23	234	-	braun, amorph
24-56	600	-	hellbraun, amorph
57-61	196	VU, Verunr.	hellbraun, glasig
62-63	72	VU, Amyrine	hellgelb, amorph
64-72	720	VU, <u>Usch</u> , Amyr.	farblos, amorph
73-74	947	VU, <u>Usch</u>	farblos, amorph
75-78	1972	<u>Usch</u>	farblos, krist.
79-85	879	<u>Usch</u> , Ct	farblos, glasig
86-88	123	<u>Usch</u> , <u>Ct</u>	farblos, amorph
89-96	1503	Ct	farblos, amorph
97-98	115	Ct, Amyr.	hellgelb, amorph
99-103	28	Ct, Ctg (schwach)	farblos, amorph
104-149	1613		hellbraun, amorph

insgesamt eluierte Substanz: 9,002 g

Literaturverzeichnis

- 1) T. Reichstein, Angew. Chemie 63, 412 (1951)
- 2) W. Withering, An Account of the Foxglove, and
some of its Medical Uses, with practical remarks
on dropsy and other deseases, Birmingham (1785)
Neuaufgabe durch C. F. Boehringer + Söhne GmbH,
Mannheim (ohne Angabe des Verlagsjahres)
- 3) A. Windaus, L. Hermanns, Ber. dtsh. Chem. Ges. 48,
991 (1915), weitere Literatur siehe dort
- 4) W. A. Jacobs et al, J. biol. Chemistry 108, 497
(1935)
- 5) A. Stoll, The cardiac glycosides, London (1937)
- 6) L. Ruzicka et al, Helv. Chim. Acta 25, 79 (1942)
- 7) W. D. Paist et al, J. Org. Chemistry 6, 273 (1941)
- 8) A. Plattner et al, Helv. Chim. Acta 20, 1432 (1947)
- 9) Privatmitteilung H. J. Voss
- 10) Privatmitteilung R. C. Shah
- 11) L. Lewin, Arch. exper. Path. Pharmacol. 71, 142 (1913)
- 12) L. Lewin, Die Pfeilgifte, Verlag Joh. Ambr. Barth,
Leipzig (1923)
- 13) K. K. Chen, F. Henderson, J. Med. Pharm. Chem. 2,
111 (1961)
- 14) G. Hesse, F. Reicheneder, Liebigs Ann. Chem. 526,
252 (1936)
- 15) G. Hesse, S.-B. Ges. Beförd. ges. Naturwiss.
Marburg 73, 3 (1938)
- 16) G. Hesse, F. Reicheneder, H. Eysenbach, Liebigs Ann.
Chem. 537, 67 (1939)
- 17) G. Hesse, H. Eilbracht, F. Reicheneder, Liebigs Ann.
Chem. 546, 233 (1941)
- 18) G. Hesse, Angew. Chem. 61, 339 (1949)
- 19) G. Hesse, K.W.F. Böckmann, Liebigs Ann. Chem. 562,
37 (1949)

- 20) G. Hesse, L.J. Heuser, E. Hütz, F. Reicheneder,
Liebigs Ann. Chem. 566, 130 (1950)
- 21) G. Hesse, H.W. Gampp, Chem. Ber. 85, 933 (1952)
- 22) G. Hesse, K. Breig, Liebigs Ann. Chem. 592, 120 (1955)
- 23) G. Hesse, G. Krehbiel, F. Rämich, Liebigs Ann. Chem.
592, 137 (1955)
- 24) G. Hesse, Naturwiss. Rundschau 9, 227 (1956)
- 25) G. Hesse, F. Exner, H. Hertel, Liebigs Ann. Chem.
609, 57 (1957)
- 26) G. Hesse, H. Hertel, Angew. Chem. 69, 61 (1957)
- 27) W. Geiger, G. Hesse, G. Lettenbauer, H. Schildknecht,
Naturwiss. 44, 328 (1957)
- 28) G. Hesse, G. Lettenbauer, Angew. Chem. 69, 329 (1957)
- 29) G. Lettenbauer, A. Saman, Liebigs Ann. Chem. 625,
140 (1959)
- 30) G. Hesse, G. Lettenbauer, Liebigs Ann. Chem. 623,
142 (1952)
- 31) G. Hesse, K. Mix, Liebigs Ann. Chem. 625, 146 (1959)
- 32) G. Hesse, H. Fasold, W. Geiger, Liebigs Ann. Chem.
625, 157 (1959)
- 33) G. Hesse, W. Geiger, Liebigs Ann. Chem. 625, 161
(1959)
- 34) G. Hesse, W. Geiger, G. Lettenbauer, Liebigs Ann. Chem.
625, 167 (1959)
- 35) G. Hesse, H. Hertel, K. Mix, Liebigs Ann. Chem. 625,
174 (1959)
- 36) G. Hesse, K. Mix, Chem. Ber. 42, 2427 (1959)
- 37) G. Hesse, G. Ludwig, Liebigs Ann. Chem. 632, 158 (1960)
- 38) G. Hesse, B. Wehling, Liebigs Ann. Chem. 679, 100 (1964)
- 39) F. Brunner, Dissertation, Erlangen (1961)
- 40) C.H. Hassal, K. Reyle, J. chem. Soc. (London) 85 (1959)
- 41) D. G. H. Crout, R.F. Curtis, C.H. Hassal, J. chem. Soc.
(London) 866 (1963)
- 42) S. Rajagopalan, Ch. Tamm, T. Reichstein, Helv. chim.
Acta 38, 1809 (1955)

- 43) F. Brüscheiller, W. Stöcklin, K. Stöckel,
T. Reichstein, *Helv. chim. Acta* 52, 2086 (1969)
- 44) A. Lardon, K. Stöckel, T. Reichstein, *Helv. chim.
Acta* 52, 1940 (1969)
- 45) F. Brüscheiller, K. Stöckel, T. Reichstein,
Helv. chim. Acta 52, 2276 (1969)
- 46) T. Reichstein, J. v. Euw, J.A. Parson,
M. Rothschild, *Science* 161, 861 (1968)
- 47) L.P. Brower, *Scientific American*, Febr. 1969
- 48) Basu und Nath, *Biochem. J.* 28, 1561 (1924)
- 49) P.B.R. Murti, T.R. Seshadri, *Proc. ind. Acad. Sci.*
18, 145 (1943)
- 50) N. Pitchandi, *J. Proc. Inst. Chem.* 20, 34 (1948)
- 51) D. Dolder, Ch. Tamm, T. Reichstein, *Helv. ohim. Acta*
38, 1364 (1955)
- 52) H.F. Linskens, M.V. Tracey, *Moderne Methoden der
Pflanzenanalyse*, Springer Verlag (Berlin) Bd. V
(1962)
- 53) G. Hesse, *Chromatographisches Praktikum*, Akad.
Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main (1968)
- 54) A. Zaffaroni, *J. Am. Chem. Soc.* 72, 3828 (1950)
- 55) F. Kaiser, *Chem. Ber.* 88, 556 (1955)
- 56) A. Stoll, E. Angliker, F. Barfuß, W. Kussmaul,
J. Renz, *Helv. chim. Acta* 34, 1460 (1951)
- 57) D.L. Kedde, *Pharm. Weekblad* 82, 741 (1947)
- 58) Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papier-
chromatographie, E. Merck, Darmstadt (ohne Jahres-
zahl)
- 59) J. Simonsen, W.C.J. Ross, *The Terpenes*, Band V,
479 (1957)
- 60) P. de Mayo, *The higer Terpenoids*, New York, 178
(1959)
- 61) H. Wunschel, *Diplomarbeit*, Erlangen (1959)
- 62) L.R. Snyder, *Principles of Adsorption Chromatography*,
M. Dekker, inc., New York (1968)

- 63) D.H.G. Crout, R.F. Curtis, C.H. Hassal, T.L. Jones, *Tetrahedron Letters* 2, 63 (1963)
- 64) D.H.G. Crout, C.H. Hassal, T.L. Jones, *J. chem. Soc. (London)* 2187 (1964)
- 65) F.O. Rice, K.K. Rice, *The Aliphatic Free Radicals*, John Hopkins Press, Baltimore (1935)
- 66) E. Bamberger, *Ber.* 19, 1818 (1886)
- 67) R.L. Burwell, *Chem. Rev.* 54, 615 (1954)
- 68) H. Meerwein in Houben-Weyl, *Methoden der organischen Chemie*, Bd. VI/3 (1965)
- 69) M.H. Karger, Y. Mazur, *J. Amer. Chem. Soc.* 90, 3878 (1968)
- 70) R.D. Youssefyeh, Y. Mazur, *Tetrahedron Letters* 1287 (1962)
- 71) L.H. Long, G.F. Freeguard, *Nature* 207, 403 (1965)
- 72) T.H. Povlock, *Tetrahedron Letters* 4131 (1967)
- 73) W. Braun, E. Hartwig, *DBP* 1160856 (1964)
- 74) I.T. Harrison, *Chem. Communications* 616 (1969)
- 75) R.G. Pearson, *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 3533 (1963)
- 76) A. Hunger, T. Reichstein, *Ber.* 85, 633 (1952)
- 77) D.H. Williams, I. Fleming, *Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1968)
- 78) G. Spiteller, *Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen*, Verlag Chemie (1966)
- 79) G. Weidemann, W. Fischer, *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 336, 189 (1964)
- 80) P. Godin, *Nature (London)* 174, 134 (1954)
- 81) W. Fischer, *Habilitationsschrift*, Erlangen (1967)
- 82) G.J. Pfeiffer, H. Adkins, *J. Amer. Chem. Soc.* 53, 1043 (1931)
- 83) C.C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita, W.W. Wells, *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 2497 (1963)
- 84) D.L. Stalling, C.W. Gehrke, R.W. Zumwalt, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31, 616 (1968)

- 85) R. Köster, K.-L. Amen, H. Bellut, W. Fenzl, *Angew. Chem.* 83, 805 (1971)
- 86) F. Krafft, A. Roos, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 26, 2823 (1886)
- 87) F. v. Konek, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 55, 108 (1922)
- 88) R. Kuhn, I. Löw, H. Trischmann, *Chem. Ber.* 88, 1492, 1690 (1955)
- 89) A.G.Mc Innes, D.H. Ball, F.P. Cooper, C.T. Bishop, *J. Chromatogr.* 1, 556 (1958)
- 90) C.T. Bishop in *Advances in Carbohydrate Chemistry*, Academic Press, New York 19 (1964)
- 91) DBP. 1010530 (1956), *Farbf. Bayer, Erf.*: H. Disselnkötter, P. Kurz
- 92) a) A.N. Elisarova, I.N. Nasarow, *Izv. Akad. S.S.S.R.*, 223 (1940); *C.A.* 36, 746 (1942)
b) I.N. Nasarow, I.B. Torgow, L.N. Terechova, *Izv. Akad. S.S.S.R.* 50 (1943); *C.A.* 38, 1729 (1944)
c) I.N. Nasarow, I.B. Torgow, *Z. obsch. Chim.* 18, 1332 (1948); *C.A.* 43, 2161 (1949)
d) I.N. Nasarow et al, *C.A.* 45, 7569 (1951)
e) I.N. Nasarow, *C.A.* 39, 1620 (1945)
- 93) I. Cologne, A. Varagnat, *Bull. Soc. Chim. (France)* 2499 (1964)
- 94) W.H. Carothers, R.A. Jacobson, *J. Amer. Chem. Soc.* 55, 1099 (1933)
- 95) L. Brandsma, *Preparative Acetylenic Chemistry*, Elsevier Publishing Comp. (1971)
- 95) a) *UV-Atlas of Organic Compounds*, Vol. I, Verlag Chemie (1966)
- 96) H.L. Riley, J.F. Morley, N.A.C. Friend, *J. Chem. Soc. (London)* 1875 (1932)
- 97) E.N. Trachtenberg in R.L. Augustine, *Oxydation Vol. I*, M. Dekker, New York (1969)
- 98) E.I. Corey, I.P. Schaefer, *J. Amer. Chem. Soc.* 82, 918 (1960)
- 99) L.F. Fieser, G. Ourisson, *J. Amer. Chem. Soc.* 75, 4404 (1953)
- 100) G. Lettenbauer, *Dissertation*, Erlangen (1958)
- 101) *Gmelins Handbuch der anorganischen Chemie*, Verlag Chemie, Berlin (1939)
- 102) R. Adams et al, *Organic Reactions V*, John Wiley & Sons, New York (1949)

LEBENS LAUF

Hannsjörg Wunschel	8501 Nürnberg-Boxdorf Steinacher-Str. 14
Geburtsdatum	12. 04. 1941
Geburtsort	Waldmünchen/Opf.
Familienstand:	verheiratet, ein Kind
Beruf des Vaters	Kaufmann (verst. 1971)
Schul Ausbildung	1947 - 1949 Volksschule Waldmünchen 1949 - 1951 Volksschule Röslau 1951 - 1961 Oberrealschule Wunsiedel (Abitur)
Wehrdienst	Okt. 1961 - März 1963 Panzergrenadierbataillon Cham/Opf. (Leutnant d. R.)
Studium	Sommersemester 1963 - Wintersemester 1969 Chemiestudium an der Universität Erlangen-Nürnberg (Diplomchemiker: 04. 12. 1969) Seitdem Doktorarbeit bei Prof. Dr. G. Hesse, Institut für Organische Chemie I, Erlangen, Henkestr. 42 Ab 01. 11. 1970 Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990
